

HLA-DP-spezifische T-Zell-Rezeptoren als Immuntherapeutika zur Behandlung
der akuten myeloischen Leukämie



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sarah Vatter
aus
Ludwigshafen am Rhein

im Jahr
2017

HLA-DP-spezifische T-Zell-Rezeptoren als Immuntherapeutika zur Behandlung
der akuten myeloischen Leukämie



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sarah Vatter
aus
Ludwigshafen am Rhein

im Jahr
2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Betreuer: Prof. Dr. med. Wolfgang Herr

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das humane Immunsystem.....	1
1.2	Die T-Zelle	1
1.2.1	Der T-Zell-Rezeptor	2
1.2.2	Die Antigenerkennung durch T-Zellen	4
1.2.2.1	Antigenpräsentation über den HLA-Komplex	4
1.2.3	Die Rolle der Korezeptoren.....	6
1.2.4	Die T-Zell-Aktivierung	7
1.2.4.1	Das erste TZR vermittelte Signal.....	7
1.2.4.2	Das zweite durch Kostimulatoren vermittelte Signal	9
1.3	Akute myeloische Leukämie (AML).....	9
1.3.1	Epidemiologie	10
1.3.2	Risikofaktoren	10
1.3.3	Klassifikation	10
1.3.4	Prognosefaktoren und Risikostratifizierung.....	11
1.3.5	Therapieansätze der AML	12
1.4	Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation	13
1.4.1	Graft-versus-Leukemia Effekt und Graft-versus-Host Erkrankung.....	14
1.4.2	Wege zur Verbesserung der GvL Reaktivität bei zeitgleicher Reduktion der GvHD Inzidenz.....	16
1.4.2.1	Die Rolle von CD4 ⁺ T-Zellen	16
1.4.2.2	Die Rolle von Zielantigenen der T-Zell-Reaktivität.....	17
1.5	Die TZR-Therapie	20
1.5.1	Optimierung der TZR-Therapie	22
1.6	Zielsetzung.....	24
2	Material & Methoden	26
2.1	Material.....	26
2.1.1	Geräte	26
2.1.2	Verbrauchsgüter & Equipment.....	26
2.1.3	Chemikalien & Reagenzien.....	27
2.1.4	Puffer und Lösungen	28
2.1.5	Zusätze	28
2.1.6	Medien.....	29

2.1.7	Zytokine	30
2.1.8	Enzyme.....	30
2.1.9	Antikörper (Ak) und Fluoreszenzfarbstoffe	30
2.1.10	Kits	32
2.1.11	Oligonukleotide	32
2.1.12	Plasmide	35
2.1.13	HLA-DP Typisierung der Spender der verwendeten AML Blasten, EBV-LCLs, Fibroblasten und PBMZs	36
2.1.14	Bakterienstämme	37
2.1.15	Programme	37
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	37
2.2.1	RNA Isolation	37
2.2.2	Klonierung von T-Zell-Rezeptor-Genen	38
2.2.3	Klonierung anderer Oberflächenmoleküle (HLA-DP, CD4)	41
2.2.4	Restriktionsverdau.....	41
2.2.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gel	42
2.2.6	Ligation	42
2.2.7	Mutagenese.....	42
2.2.8	Murinisierung der TZR-Sequenz	43
2.2.9	Generierung eines TZR β -F2A-TZR α Fusionsgens	44
2.2.10	Transformation	45
2.2.11	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	46
2.2.12	Linearisierung von Plasmid-DNA zur Durchführung einer <i>in vitro</i> Transkription (IVT).....	46
2.2.13	Phenol-Chlorform-Aufreinigung der Ansätze zur Durchführung einer IVT	47
2.2.14	Generierung und Aufreinigung von <i>in vitro</i> transkribierter (IVT) RNA	47
2.2.15	Identifizierung des TZR V β -Repertoires.....	48
2.3	Zellbiologische Methoden	48
2.3.1	Isolation von PBMZ und AML Blasten über Ficoll-Dichtegradienten- zentrifugation	48
2.3.2	Zelllinien	49
2.3.2.1	Generierung und Kultivierung von B-lymphoblastoiden Zelllinien	49
2.3.3	Generierung von reifen dendritischen Zellen	50
2.3.4	Kultivierung und Vorbehandlung von AML Blasten.....	50

2.3.5	Kultivierung und Vorbehandlung von Fibroblasten.....	50
2.4	Immunbiologische Methoden	51
2.4.1	Magnetische Zellseparation.....	51
2.4.2	Kultivierung von durch magnetische Zellseparation isolierten T-Zellen.....	51
2.4.3	Durchflusszytometrie	52
2.4.4	Transfektion von Zellen mit RNA durch Elektroporation	53
2.4.5	Stabile TZR-Integration durch retrovirale Transduktion	53
2.4.5.1	Herstellung von Retrovirus-haltigen Kulturüberständen	54
2.4.5.2	Retrovirale Transduktion von T-Zellen	54
2.4.5.3	T-Zell-Stimulation nach retroviraler Transduktion.....	55
2.4.6	IFN- γ ELISpot.....	55
2.4.7	$^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsanalyse.....	56
2.5	Mausversuche	57
2.5.1	Zelltransfer in NSG Mäuse	58
2.5.2	Aufarbeitung von Knochenmark und Milz zur phänotypischen Untersuchung	59
2.6	Statistische Methoden.....	59
3	Ergebnisse.....	61
3.1	Isolation und Klonierung von allo-HLA-DPB1-spezifischen TZR aus humanen Leukämie-reaktiven CD4 $^{+}$ T-Zell-Klonen.....	61
3.2	Funktionelle Charakterisierung TZR _{DPB1} transfizierter CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T-Zellen mittels IFN- γ ELISpot	65
3.3	Der CD4 Korezeptor-abhängige TZR _{DPB1*06:01}	69
3.4	Der CD4 Korezeptor-unabhängige TZR _{DPB1*04:01}	73
3.4.1	Erkennung von primären AML Blasten durch TZR _{DPB1*04:01} RNA transfizierte T-Zellen.....	76
3.4.2	Reaktivität TZR _{DPB1*04:01} RNA transfizierter T-Zellen gegen Gewebezellen....	79
3.4.3	Funktionelle Charakterisierung TZR _{DPB1*04:01} transduzierter T-Zellen <i>in vivo</i>	82
3.5	Generierung allo-HLA-DPB1-spezifischer CD4 Korezeptor-unabhängiger T-Zell-Populationen.....	87
3.5.1	Spezifität von HLA-DP-spezifischen CD4 T-Zell-Populationen.....	88
3.5.2	Funktionalität allo-HLA-DPB1-spezifischer CD4 $^{+}$ T-Zell-Populationen.....	89
3.5.3	CD4 Korezeptorunabhängigkeit von allo-HLA-DPB1-spezifischen CD4 $^{+}$ T-Zell-Populationen	90

3.5.4	Kreuzreaktivität CD4 Korezeptor-unabhängiger, allo-HLA-DPB1-spezifischer CD4 ⁺ T-Zell-Populationen gegen nicht-hämatopoetische Zielzellen	92
3.5.5	Charakterisierung ausgewählter CD4 T-Zell-Populationen	93
4	Diskussion	95
4.1	HLA-DP-spezifische TZR für die Immuntherapie der akuten myeloischen Leukämie	96
4.1.1	Expression HLA-DPB1-spezifischer TZR	96
4.1.2	Funktionalität HLA-DP-spezifischer TZR in humanen T-Zellen in Abhängigkeit von dem CD4 Korezeptor	98
4.1.3	Erkennung von primären AML Zellen durch HLA-DP-spezifische TZR <i>in vitro</i>	99
4.1.4	Funktion des HLA-DPB1*04:01-spezifischen TZR im Mausmodell	100
4.1.5	Reaktivität von T-Zellen mit HLA-DPB1*04:01-spezifischen TZR gegen nicht-hämatopoetische Zellen	103
4.1.6	Risiken und Potential einer HLA-DPB1*04:01-spezifischen TZR-Therapie ..	104
4.2	Generierung von HLA-DP-spezifischen, CD4 Korezeptor-unabhängigen CD4 ⁺ T-Zell-Klonen	108
5	Zusammenfassung	112
6	Verzeichnisse	114
6.1	Literaturverzeichnis	114
6.2	Abbildungsverzeichnis	121
6.3	Tabellenverzeichnis	122
6.4	Abkürzungsverzeichnis	123
7	Appendix	125
7.1	Selbstständigkeitserklärung	125
7.2	Danksagung	126
7.3	Lebenslauf	128

1 Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

Das humane Immunsystem ist ein hoch komplexes, streng kontrolliertes Netzwerk von Molekülen und Zellen, welches der Abwehr verschiedenster Pathogene wie Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren dient, aber auch in gewissem Maße zur Eradikation entarteter, körpereigener Zellen beitragen kann. Dabei lassen sich sowohl konzeptionell als auch mechanistisch zwei funktionelle Untereinheiten unterscheiden. Zum einen die angeborene, zum anderen die erworbene/adaptive Komponente. Das angeborene unspezifische Immunsystem wird sofort nach Eindringen eines Erregers aktiviert. Zu diesem gehören Serumbestandteile wie Akute-Phase-Proteine, Kollektine, Komplementfaktoren und Zytokine, aber auch Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK) sowie dendritische Zellen (DZs). Diese erkennen über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren unveränderliche pathogene Strukturen, wozu mikrobielle Moleküle (z.B. Lipopolysaccharide, LPS), bakterielle DNA, virale doppelsträngige (ds) RNA oder Mannose zählen¹. Um eine maximale Immunabwehr zu gewährleisten greifen beide Teile des Immunsystems ineinander über. So dient die angeborene Komponente nicht nur der Bekämpfung von Pathogenen, sondern auch der Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Dieses zeichnet sich durch die spezifische Erkennung eines Antigens und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Anders als Zellen der angeborenen Immunität, die nur definierte molekulare Strukturen erkennen, können die Zellen des adaptiven Systems auf eine Vielzahl von körperfremden Strukturen reagieren. Grund für dieses enorm große Repertoire an unterschiedlichen Antigenspezifitäten sind die Oberflächenrezeptoren, welche über somatische Rekombinationen einzelner Rezeptor-Gensegmente eine große Diversität erlangen können. Zu den Zellen der adaptiven Immunabwehr gehören unter anderem B-Lymphozyten und T-Lymphozyten. B-Zellen reifen im Knochenmark heran, werden durch Bindung ihres spezifischen Antigens aktiviert und bilden durch Produktion und Sekretion von Antikörpern die humorale Immunantwort².

1.2 Die T-Zelle

T-Zellen entwickeln sich im Knochenmark aus pluripotenten CD34⁺ Stammzellen und reifen aus den Vorläuferzellen im Thymus aus. Sie vermitteln als Effektorzellen hauptsächlich die zelluläre Immunantwort, tragen aber auch als Helfer T-Zellen (T_H) zur humoralen Immunantwort bei. Dabei tragen ausgereifte T-Lymphozyten den membrangebundenen T-Zell-Rezeptor (TZR) auf ihrer Zelloberfläche. Über diesen erkennen die Zellen Peptide, die

von körpereigenen Proteinen, den sog. Haupthistokompatibilitätskomplexen (engl.: *major histocompatibility complex*; MHC), beim Menschen als Humane Leukozyten Antigene (HLA) bezeichnet, präsentiert werden. In Abhängigkeit von ihrer Funktion sowie dem Auftreten bestimmter Oberflächenmoleküle lassen sich die T-Lymphozyten in verschiedene Gruppen einteilen. Dazu gehören zum einen die immunmodulatorischen $CD4^+$ T-Zellen. Sie regulieren die adaptive Immunantwort nach Antigenstimulation durch die Sezernierung verschiedener Mediatoren, besitzen aber neben der Hilfsfunktion auch zytotoxische Eigenschaften. In Abhängigkeit von den produzierten Zytokinen lassen sich $CD4^+$ T-Zellen funktionell weiter unterscheiden^{3,4}. Zum einen in die Interleukin (IL)-2, Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sezernierenden T_H1 Zellen, die Makrophagen aktivieren und vornehmlich der Abwehr intrazellulärer Erreger dienen⁵. Eine andere Gruppe wird von den T_H2 Zellen gebildet. Diese produzieren IL-4, -5 und -13 und aktivieren hierüber B-Zellen, wodurch sie von großer Bedeutung bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene sind⁶. T_H9 Zellen sind für den Schutz vor Parasiten, wie Nematoden von besonderer Bedeutung. Sie produzieren IL-9, welches Auswirkungen auf die Proliferation von Mast- und T-Zellen hat⁷. T_H22 Zellen sind IL-22 sezernierende T-Zellen deren Funktion noch nicht vollständig charakterisiert ist, von denen jedoch bekannt ist, dass sie eine wichtige Rolle bei Inflammation und Autoimmunerkrankungen einnehmen⁸. T_H17 Zellen sind für die Immunität gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze wichtig. Außerdem spielen sie bei bestimmten Autoimmunerkrankungen eine Rolle⁵. Sie produzieren das Zytokin IL-17. Durch dieses Zytokin wird die Migration von Neutrophilen und Makrophagen stimuliert und die Proliferation bestimmter T-Zell-Subtypen angeregt⁹. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sind besonders wichtig bei der Inhibition der Immunantwort, wodurch sie die Selbsttoleranz des Immunsystems regulieren¹. Die zweite Gruppe der T-Lymphozyten sind die $CD8^+$ T-Zellen. Diese vermitteln über direkten Zellkontakt die Eradizierung körpereigener infizierter bzw. entarteter Zellen. Dabei wird deren Zytotoxizität im Wesentlichen durch zwei unabhängige Mechanismen vermittelt. Zum einen agieren $CD8^+$ T-Zellen über den Granula-Exozytose-Weg mittels Perforin und Granzym, zum anderen durch die Fas-Ligand/Fas-Rezeptor Interaktion¹.

1.2.1 Der T-Zell-Rezeptor

Jeder T-Lymphozyt besitzt zur spezifischen Antigenerkennung ca. 30.000 identische Antigen-Rezeptor-Komplexe auf der Zelloberfläche¹. Sie werden aus dem TZR und den für die Signaltransduktion notwendigen $CD3$ -Komplex gebildet¹⁰. Der TZR ist ein membran-gebundener Rezeptor, der aus zwei Untereinheiten besteht (Abb. 1.1). Der Großteil der in

T-Zellen vorkommenden TZR setzt sich aus einer glykosylierten α - und einer β -Peptidkette zusammen, die ein α/β -Heterodimer an der Zelloberfläche bilden. Bei rund 1-10% der Gesamt-T-Zell-Population des peripheren Blutes bildet dagegen ein Heterodimer aus γ - und δ -Kette den Rezeptor¹¹. Diese sind strukturell der α - und β -Peptidkette sehr ähnlich. Die beiden α - und β -Rezeptorketten bestehen je aus einer aminoterminalen variablen Region und einer carboxyterminalen konstanten Region. Dabei beinhaltet die extrazelluläre, variable Domäne beider Ketten einen Bereich, der für die Erkennung von HLA-gebundenen Peptiden (Antigen) zuständig ist. Hierbei sind drei hypervariable, bindungsentscheidende Bereiche, die sogenannten CDR (engl.: *complementarity determining region*), von besonderer Bedeutung. Während die CDR3 Sequenz beider Ketten den größten Anteil des direkten Antigenkontakts vermittelt, interagieren die CDR2 Regionen mit den α -Helices der HLA-Moleküle. Die CDR1 Domäne bindet an den C-Terminus (β -Kette) bzw. an den N-Terminus (α -Kette) des präsentierten Peptids⁴. Die konstante Domäne besteht aus einer extrazellulären Region, die über eine Gelenk-Region und eine transmembrane, hydrophobe Domäne mit einem kurzen carboxyterminalen, zytoplasmatischen Anteil verbunden ist. Hierbei bildet sich in der Gelenk-Region über ein Cystein eine Disulfidbrücke, die das Heterodimer miteinander verbindet⁴.

Da der Mensch während seines Lebens fortwährend auf neue Pathogene reagieren muss, ist eine hohe Diversität des TZR essentiell für das Überleben. Durch einen komplexen Prozess, der TZR-Gensegment-Umlagerung, kann der Mensch ein Repertoire von 1×10^8 verschiedenen TZR besitzen (Abb. 1.1)¹². Grundlage hierfür ist die Genstruktur der beiden TZR-Ketten. Während die α -Kette von Genen des Chromosoms 14 kodiert wird, liegt der Genlocus der β -Kette auf Chromosom 7. Dabei setzt sich der TZR α -Lokus aus 70-80 variablen (V), 61 verbindenden (J, engl.: *joining*) und einem konstanten Gensegment (C) zusammen. Dagegen bilden 52 variable Segmente mit zwei Gruppen von J-Gensegmenten, die je ein konstantes und ein Diversitätsgensegment (D) enthalten, den Genlocus der β -Kette¹. Während der T-Zell-Entwicklung im Thymus werden zunächst die einzelnen V, D, und J-Gensegmente zu einem zusammenhängendem TZR V-Exon rekombiniert¹. Zusätzlich zur Rekombination der verschiedenen Segmente werden währenddessen im Verbindungsbereich der kombinierten Fragmente nicht-Keimbahn-kodierte Nukleotide eingefügt und vorhandene Nukleotide durch Endonukleasen deletiert. Nach Abschluss der Rekombination besteht die TZR-DNA aus einem V-(D)-J-Segment und der C-Region, welche durch ein Intron voneinander getrennt sind. Erst nach der Transkription werden die Introns der RNA ausgeschnitten und die rekombinanten V-Exons mit der konstanten Region zusammengefügt (Spleißen). Dabei entstehen für die α -Kette 4880-6100 Kombinationsmöglichkeiten sowie 1352 für die β -Kette^{4,13}.

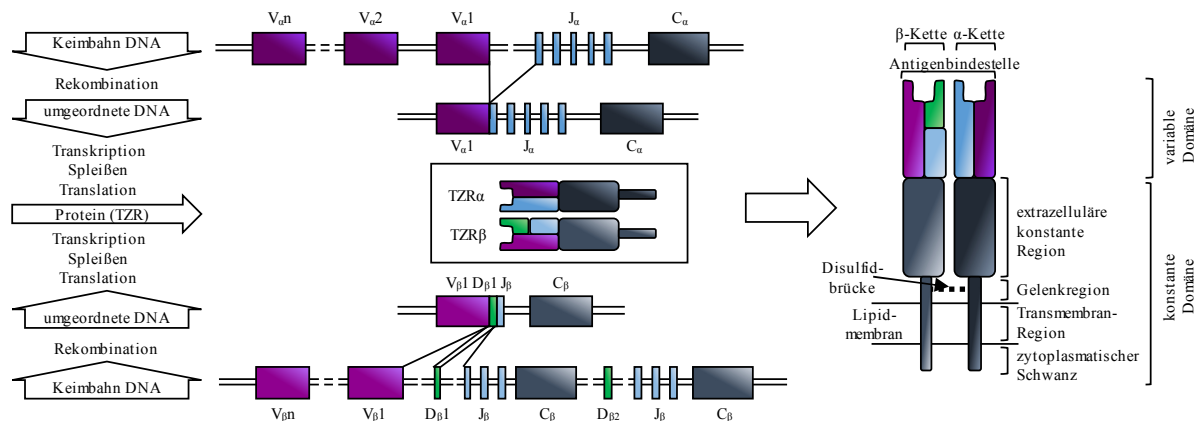


Abb. 1.1.: Aufbau eines T-Zell-Rezeptors mit zugehörigem Genlokus. Die TZR-Gene werden durch den TZR-Genlokus auf Chromosom 14 (α -Kette) bzw. Chromosom 7 (β -Kette) kodiert. Zur Entwicklung eines funktionellen TZR werden zunächst durch TZR-Gensegment-Umlagerungsprozesse die V- (lila), D- (grün; im Falle der β -Kette) und J- (blau) Gensegmente rekombiniert. Daraufhin wird die rekombinierte DNA transkribiert, Intros zwischen den rekombinanten V-Exons und dem konstanten Segment (grau) durch Spleißen entfernt und das TZR-Protein translatiert¹. Durch weitere Prozesse wird ein reifer TZR auf der Zelloberfläche präsentiert. Dieses ist ein Heterodimer aus zwei Polypeptidketten, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden und über eine transmembrane Region in der Lipidmembran der T-Zelle verankert ist. Dabei besitzen beide Ketten eine variable sowie eine konstante Domäne. Adaptiert nach Murphy und Janeway¹.

Während der Entwicklung eines reifen TZR wird zunächst die β -Kette rekombiniert. Diese wird zusammen mit einer Prä-TZR α -Kette und dem CD3-Komplex als Prä-TZR auf der Zelloberfläche von unreifen T-Lymphozyten (Thymozyten) exprimiert. Die durch den Prä-TZR mit funktioneller β -Kette vermittelten Signale führen letztendlich zu einem Proliferationsschub, der Expression der Korezeptoren CD4 und CD8 sowie zum Rearrangement der TZR α -Kette². In der darauffolgenden, sogenannten Repertoireselektion, werden unreife, naive T-Zellen durch positive und negative Selektionsprozesse selektioniert. Dabei überleben und differenzieren nur diejenigen T-Zellen, die körperfremde Antigene über HLA-Präsentation erkennen, während Thymozyten mit hochaffinen Rezeptoren für Selbstantigene in Apoptose gehen¹⁴. Reife Thymozyten wandern als naive T-Lymphozyten in die sekundären lymphatischen Organe (Lymphknoten, Milz, Mandeln, Peyersche Plaques) sowie in das Blut aus, um dort durch die Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) aktiviert zu werden¹.

1.2.2 Die Antigenerkennung durch T-Zellen

Im Vergleich zu B-Zellen und Antikörpern sind T-Zellen nicht in der Lage, Antigene in ihrer natürlichen, nativen Form zu erkennen. Sie sind abhängig von der Prozessierung dieser Proteine zu Peptidfragmenten. Dabei hängt die T-Zell-Aktivierung nicht nur von der Erkennung eines Antigens ab, auch die Präsentation dieser Peptide über HLA-Moleküle ist grundlegend¹.

1.2.2.1 Antigenpräsentation über den HLA-Komplex

Die humanen HLA-Moleküle sind Glykoproteine, die von einer Gruppe von über 200 Genen kodiert werden. Diese Gene, die von jedem Elternteil als Haplotyp vererbt werden, sind beim

Menschen fast ausschließlich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.31) in einer hoch polymorphen Region zu finden. Sie lassen sich topographisch, strukturell sowie funktionell in drei Gruppen (HLA-Klasse I, II und III) unterteilen (Abb. 1.2). Strukturell besitzen alle HLA-Klasse I Moleküle vier Domänen. Hierzu zählen die drei hochvariablen Domänen der α -Kette sowie das angelagerte, für die Stabilität des Moleküls essentielle β 2-Mikroglobulin (codiert auf Chromosom 15). Während die α 3-Domäne das Glykoprotein in der Zellmembran verankert, bilden die α 1- und α 2-Domäne eine Bindetasche, in der Peptide mit einer Größe von bis zu zehn Aminosäuren präsentiert werden. Diese werden üblicherweise beim Abbau intrazellulärer Proteine im Proteasom gebildet und im endoplasmatischen Retikulum (ER) auf HLA-Klasse I Moleküle geladen, welche so zur Zelloberfläche transportiert werden. Zu den HLA-Klasse I Molekülen gehören die Isotypen HLA-A, -B und -C, die ubiquitär auf allen nukleären Zellen exprimiert werden. HLA-Klasse II Moleküle bestehen dagegen aus einer schweren α - und einer leichten β -Kette, wobei beide Polypeptidketten aus zwei Domänen zusammengesetzt werden. Während die α 2- und β 2-Strukturen die Verankerung des Proteins in der Zellmembran übernehmen, werden Peptide über eine, aus der α 1- und β 1-Domäne gebildeten Grube präsentiert. Hierbei kann das Antigen bis zu 20 Aminosäuren umfassen. Zu präsentierende Peptide werden über Phagozytose von HLA-Klasse II exprimierenden Zellen, sogenannten professionellen APZs, wozu dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen gehören, aufgenommen. Diese Peptide werden im Anschluss lysosomal abgebaut und auf das im ER gebildete HLA-Klasse II Molekül im Endosom übertragen. Daraufhin erfolgt die Präsentation der Peptid-beladenen HLA (pHLA) Moleküle auf der Zellmembran. Zu den HLA-Antigenen der HLA-Klasse II gehören HLA-DP, -DQ und -DR. Bei der Beladung des Peptids auf die eben beschriebenen Moleküle spielen mit HLA-DO und -DM zwei weitere HLA-Klasse II Moleküle eine wichtige Rolle. Während HLA-DM bei der Übertragung eines Peptids auf HLA-DP, -DQ oder -DR im Endosom eine Chaperonfunktion übernimmt, inhibiert HLA-DO diesen Schritt durch pH-abhängige Regulation¹⁵. Zu der dritten Gruppe der humanen HLA-Moleküle (HLA-Klasse III) gehören Plasmaproteine (C₂, C₄, Faktor B), die zum Komplementsystem, einem Teil des angeborenen Immunsystems, gezählt werden¹⁶.

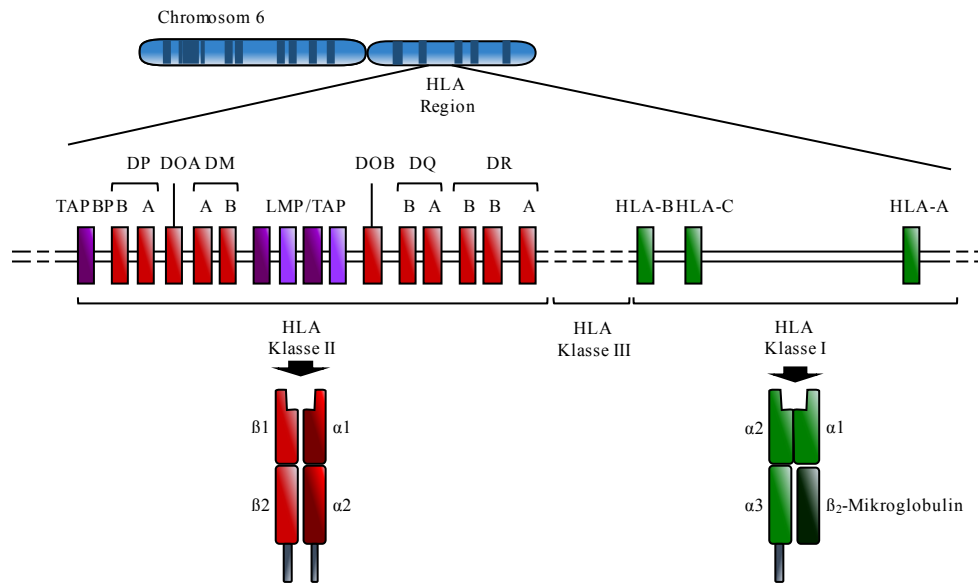


Abb. 1.2.: Aufbau des HLA-Genlokus sowie schematische Darstellung der HLA-Moleküle. Mit Ausnahme des β ₂-Mikroglobulins liegen die Gene, die für die HLA-Moleküle der drei Klassen kodieren, auf Chromosom 6. Dabei setzen sich alle HLA-Klasse I Moleküle (HLA-A, -B, -C) aus einer drei-domänigen α -Kette und einem β ₂-Mikroglobulin zusammen. HLA-Klasse II Moleküle (HLA-DQ, -DR, -DP) bestehen dagegen aus einer α -Kette und einer β -Kette mit je zwei Domänen¹.

1.2.3 Die Rolle der Korezeptoren

Die Erkennung spezifischer Antigene basiert auf der Bildung eines tetramolekularen Komplexes aus einem HLA-Molekül, dem darin gebundenen Peptid, dem TZR-Heterodimer sowie einem seiner beiden Korezeptoren (CD4 bzw. CD8). Dabei stabilisiert der Korezeptor die Bindung des TZR an das HLA Molekül. Zusätzlich rekrutiert er die Tyrosinkinase Lck (engl.: *lymphocyte-specific protein tyrosin kinase*) zum Komplex aus TZR:pHLA, welche zur Aktivierung der T-Zelle beiträgt. Je nach T-Zell-Subtyp besitzen T-Zellen nach der Repertoireselektion im Thymus in der Regel entweder den CD4 oder den CD8 Korezeptor. Das CD4 Molekül ist ein monomeres, transmembranes Glykoprotein, welches aus vier Immunglobulin (Ig)-ähnlichen extrazellulären Domänen und einem zytoplasmatischen Teil besteht. Dabei interagiert die am weitesten von der T-Zell-Membran entfernte D1 Domäne mit der β ₂-Domäne des HLA-Klasse II Moleküls. CD8 besteht aus den Membran-ständigen Glykoproteinen CD8 α und CD8 β . Dabei liegt der Korezeptor entweder als Heterodimer (CD8 α /CD8 β) oder seltener als Homodimer aus zwei CD8 α -Ketten vor. Beide Glykoproteine verfügen über eine extrazelluläre variable Immunglobulindomäne, eine Transmembranregion und einen kurzen, intrazellulären Bereich. Die extrazelluläre Domäne beider Proteine interagiert mit der α ₃-Domäne des HLA-Klasse I Moleküls, jedoch kann nur der zytoplasmatische Anteil der α -Kette Lck binden und damit die T-Zelle aktivieren^{4,17}.

1.2.4 Die T-Zell-Aktivierung

1.2.4.1 Das erste TZR vermittelte Signal

Durch die Erkennung und Bindung des TZR an den Peptid/HLA-Komplex wird eine mehrstufige Signalübertragungskaskade induziert, die mit der Aktivierung der T-Zelle assoziiert ist. Wichtig hierfür ist die Mitwirkung des zur Immunglobulin-Superfamilie gehörigen, membranständigen CD3 Komplexes, welcher aus vier Polypeptidketten (einer γ -, einer δ - sowie zwei ϵ -Ketten) gebildet wird und zusammen mit dem TZR sowie den beiden ζ -Ketten den TZR-CD3 Komplex bildet (siehe Abb. 1.3)¹⁸. Der intrazelluläre Anteil der CD3 γ -, δ -, und ϵ -Kette enthält jeweils ein, während die ζ -Kette insgesamt drei hochkonservierte Tyrosin-Phosphorylierungs-Motive beinhaltet. Die Phosphorylierung dieser sog. ITAMs (engl.: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) ist der erste essentielle Schritt der Signalweiterleitung des Rezeptors nach Bindung an sein Antigen. Verantwortlich für die Phosphorylierung ist unter anderem die mit den Korezeptormolekülen assoziierte und durch die Antigenbindung mobilisierte Proteintyrosinkinase Lck. Die ITAM-Sequenz wird dadurch zur Bindungsstelle von SH2-Domänen beinhaltenden Molekülen, zu denen die Tyrosinkinase Zap70 (engl.: *zeta-chain-associated protein kinase of 70kDa*) gehört, welche nach Bindung wiederum von der Src-Kinase Lck phosphoryliert wird¹⁹. Durch einen mehrstufigen Prozess über Phosphorylierung der Gerüstproteine LAT (engl.: *linker for activation of T cells*) und SLP-76 (engl.: *SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa*) und die damit verbundene Rekrutierung und Aktivierung von Proteinen, wie Phospholipase C- γ (PLC- γ), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K), Interleukin-2 induzierbare T-Zell-Kinase (Itk) und Ras zum TZR-Komplex, entsteht ein Multiproteinkomplex, der als Signalosom bezeichnet wird. Dieser ist entscheidend für die Weiterleitung des TZR-Signals²⁰. Es kommt letztendlich zur Induktion eines Calcium-Flux, und damit Aktivierung der Phosphatase Calcineurin, zur Aktivierung der Proteinkinase C- θ und zur Induktion der MAP-Kinasen-Kaskade. All diese Faktoren bewirken die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, welche durch spezielle Gentranskription u.a. zur Proliferation und Differenzierung der Lymphozyten führen. Dadurch wird auch eine strukturelle Umlagerung des Zytoskeletts des Lymphozyten induziert^{1,21}.



zeta-chain-associated protein kinase of 70kDa. Modifiziert nach Janeway¹.

Generierung einer stabilen IS auftreten, ist diese nicht an einer transienten T-Zell-Aktivierung

beteiligt. Ihre Funktion liegt vielmehr darin, eine stabile Interaktion zwischen der T-Zelle und der APZ für mehrere Stunden zu etablieren, um durch kontinuierliche Signalweiterleitung eine volle Effektorfunktion zu vermitteln^{23,24}.

1.2.4.2 Das zweite durch Kostimulatoren vermittelte Signal

Für die effiziente, vollständige Aktivierung einer naiven oder ruhenden T-Zelle ist die alleinige Bildung eines tetramolekularen Komplexes aus TZR:pHLA und Korezeptor nicht ausreichend. Nach dem 2-Signal Modell spielen kostimulatorische Moleküle als zweites Signal eine fundamentale Rolle. Fehlt dieses kostimulatorische Signal, gehen die Zellen in einen Zustand der Anergie über und werden letztendlich apoptotisch¹. Dieses System dient der Absicherung, dass nur professionelle APZ mit TZR spezifischem pHLA-Komplex naive T-Zellen aktivieren können. Zu diesen zählt das in der T-Zell-Membran verankerte CD28, welches durch die Interaktion mit den Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) die Aktivierung der T-Zelle durch eine intrazelluläre Signalkaskade verstärkt. Diese führt zur Expression von IL-2, zu einer erhöhten Proliferation des Lymphozyten sowie dessen Schutz vor Apoptose. Weitere aktivierende Kostimulatoren einer T-Zelle sind ICOS, CD30, CD27, SLAM, OX40 und 4-1BB²⁵. Jedoch gibt es nicht nur kostimulatorische, sondern auch inhibitorische Moleküle, welche die Aktivierung, Proliferation und Zytokinproduktion der T-Zelle mindern und somit eine Überaktivität der T-Zellen verhindern. Hierzu zählt CTLA-4, dessen Expression durch CD3- und CD28-Signale induziert wird und welches mit CD28 um die Bindung an CD80/86 konkurriert. CTLA-4 besitzt jedoch eine höhere Affinität zu diesen Liganden und inhibiert somit die weitere Aktivierung der T-Zellen. Weitere wichtige inhibitorische Moleküle sind PD-1 sowie BTLA. Diesen Mechanismus der T-Zell-Inhibition machen sich manche maligne Zelle zu Nutze, um der Erkennung und damit der Eliminierung durch T-Zellen zu entgehen²⁶.

1.3 Akute myeloische Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Erkrankung des hämatopoetischen Systems, der eine maligne Entartung früher myeloider Vorläuferzellen zu Grunde liegt. Folge dieser Transformation ist der Verlust des Differenzierungspotentials. Durch die erhaltene Proliferationskapazität expandieren unreife, myeloide Progenitorzellen unkontrolliert. Die Akkumulation dieser klonalen, reifungsgestörten sowie schnell wachsenden myeloiden Blasten verursacht so eine kontinuierliche Verdrängung der normalen Hämatopoese, so dass eine hämatopoetische Insuffizienz (Granulozytopenie, Thrombozytopenie, Anämie) entsteht. Dies kann ohne Behandlung zum raschen Tod des Patienten führen²⁷.

1.3.1 Epidemiologie

Eine im Jahr 2014 von der *World Health Organisation* (WHO) veröffentlichte Studie zeigte, dass 2012 weltweit 351.965 Menschen neu an Leukämie erkrankten. Die Inzidenz lag dabei bei 4,7 Fällen pro 100.000 Menschen. Hierbei wird laut WHO die Diagnose einer AML gestellt, wenn 20% aller nukleären Zellen des Knochenmarks und/oder des Blutes aus pathologischen Myeloblasten bestehen. Die Inzidenz steigt mit dem Alter kontinuierlich an, wobei Männer häufiger erkranken als Frauen. Durch Chemotherapie kann eine hohe Remissionsrate erreicht werden, wobei jedoch ein Großteil der Patienten ein Rezidiv erleidet^{28,29}.

1.3.2 Risikofaktoren

Es gibt gewisse, wenn auch wenige, etablierte Risikofaktoren, die für die Entwicklung einer AML ausschlaggebend sind. Hierzu zählen die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung sowie der Kontakt mit Benzolen oder Benzol-Derivaten³⁰. Zwischen 10-15% aller Patienten erkranken an einer AML infolge der Behandlung anderer Malignome mit Zytostatika wie Alkylanzien (Schädigung der DNA durch Einbau von Alkylgruppen) oder Topoisomerase-Hemmstoffen (z.B. Etoposid oder Anthrazykline) oder als Folge einer Strahlentherapie^{31,32}. Auch andere hämatopoetische Erkrankungen, wie das myelodysplastische Syndrom (MDS) oder eine chronische myeloproliferative Erkrankung (z.B. idiopathische Myelofibrose, Polycythaemia vera oder essentielle Thrombozythämie) können Grundlage für die Entwicklung einer AML sein³³. Von entscheidender Bedeutung scheinen auch genetische Dispositionen zu sein, die besonders häufig mit dem späteren Auftreten einer AML assoziiert sind. Hierzu zählen Erkrankungen, die mit chromosomalen Veränderungen einhergehen, wie zum Beispiel Trisomie 21 oder seltenere genetische Erkrankungen, wie das Bloom-Syndrom oder die Fanconi-Anämie³⁴. Aber auch Menschen mit Neurofibromatosen, Mutationen im G-CSF-Rezeptor oder mit einer Keimbahnmutation im C/EBP α -Gen haben ein größeres Risiko an AML zu erkranken^{34,35}.

1.3.3 Klassifikation

Im Laufe der letzten Jahrzehnte haben sich zwei Systeme zur Klassifikation der Subtypen der AML etabliert. Zum einen die im Jahre 1976 von den Hämatopathologen der „*French-American-British (FAB) Co-operativ Group*“ ausgearbeitete systematische Einteilung, welche in den darauffolgenden Jahren immer weiter ergänzt wurde. Hierbei wird die AML nach zytomorphologischen und zytochemischen Charakteristika (Nachweis von Myeloperoxidasen, unspezifische Esterasen) in acht Untergruppen (M0-M7) unterteilt³⁶.

Auf Grund der großen molekularen und zytogenetischen Heterogenität dieser Erkrankung wird die FAB-Einteilung zusehends von einer neueren Klassifikation der WHO ersetzt. Diese zweite systematische Einteilung nutzt nicht nur die Morphologie, sondern bezieht auch genetische und immunophänotypische Faktoren zur Unterscheidung der AML Subtypen mit ein. Hierbei wird differenziert zwischen AML mit wiederkehrenden genetischen Aberrationen, AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen, Therapie-assoziierte myeloische Neoplasie, AML nicht weiter spezifiziert, myeloiden Sarkomen, myeloischer Proliferation bei Down-Syndrom und akute Leukämien unklarer Linienzugehörigkeit³⁷.

1.3.4 Prognosefaktoren und Risikostratifizierung

Das durchschnittliche Fünf-Jahres-Überleben aller AML-Patienten liegt in Deutschland zurzeit bei 22,8%³⁸. Da es sich bei der AML jedoch um eine sehr heterogene Erkrankung handelt, ist die Erstellung einer individuellen Prognose von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben patientenassoziierten Faktoren gibt es krankheitsassoziierte Aspekte, denen eine prognostische Relevanz zugeschrieben wird. Zu den patientenabhängigen Einflüssen zählt ein fortgeschrittenes Alter, der allgemeine Gesundheitszustand sowie Komorbiditäten, die zur therapieassoziierten Mortalität (TRM) beitragen³⁹. Patienten, die sich aufgrund eines hohen Alters oder Komorbiditäten nicht für hochintensive Therapieansätze eignen, haben ein medianes Überleben von fünf bis zehn Monaten⁴⁰. Den stärksten prognostischen Einfluss auf das Therapieansprechen und das Überleben der Patienten haben neben dem Alter molekulare bzw. zytogenetische Veränderungen der AML. Nach der *EuropeanLeukemiaNet* (ELN) Klassifikation von 2017 können AML Patienten auf Grund definierter zytogenetischer und molekulargenetischer Aberrationen in drei Gruppen mit günstiger, intermediärer oder ungünstiger Prognose eingeteilt werden (Tab. 1.1)⁴¹. Dabei liegt die durchschnittliche Drei-Jahres-Überlebensrate in Korrelation mit dieser Klassifikation von Patienten mit günstiger Prognose bei 66%, mit intermediärer Prognose bei 28-45% und bei Patienten der Gruppe mit ungünstigster Prognose bei 12%^{42,43}. Weitere Risikofaktoren sind eine erhöhte Laktatdehydrogenase (LDH) sowie erhöhte Leukozytenzahlen bei Erstdiagnose⁴⁴.

Tab. 1.1.: Molekular- und zytogenetische Risikogruppen der AML gemäß des *EuropeanLeukemiaNet* (ELN)⁴¹.

ELN-RISIKOGRUPPE	ABERRATIONEN
GÜNSTIG	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16) (p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutiert ohne <i>FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD</i> ^{niedrig*} <i>CEBPA</i> biallelisch mutiert
INTERMEDIÄR	<i>NPM1</i> mutiert und <i>FLT3-ITD</i> ^{hoch*} Wildtyp <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD</i> ^{niedrig*} t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> , nicht als günstig oder ungünstig klassifizierte zytogenetische Anomalien
UNGÜNSTIG	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> Genumlagerung t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3;q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2</i> , <i>MECOM(EV11)</i> -5 oder del(5q); -7; -17/abn(17p) komplexer Karyotyp, monosomaler Karyotyp Wildtyp <i>NPM1</i> und <i>FLT3-ITD</i> ^{hoch*} <i>RUNX1</i> mutiert <i>ASXL1</i> mutiert <i>TP53</i> mutiert

*Ermittelt über eine semi-quantitative Messung mittels DNA-Fragment Analyse zur Bestimmung des Verhältnisses von mutiertem zu Wildtyp *FLT3* Allel, der sog. *allelic ratio* als Quotient der AUC (*area under the curve*) für *FLT3-ITD* dividiert durch die AUC für *FLT3*-Wildtyp. Dabei wird ein Mutant-Wildtyp-Allel-Quotient von <0.5 als *FLT3-ITD*^{niedrig} und ein Mutant-Wildtyp-Allel-Quotient von ≥0.5 als *FLT3-ITD*^{hoch} bezeichnet.

1.3.5 Therapieansätze der AML

Die klassische Therapie der AML kann in zwei Phasen eingeteilt werden. Das Ziel der ersten sog. Induktionsphase ist das Erreichen einer kompletten morphologischen Remission (CR; weniger als 5% Blasten im Knochenmark sowie >1000/μl Neutrophile und ≥100.000/μl Thrombozyten im peripheren Blut)⁴⁵. Das hierfür am häufigsten verwendete und in den letzten vier Dekaden kaum abgeänderte Behandlungsprotokoll setzt sich aus einer siebentägigen Dauerinfusion mit Cytarabin sowie der zusätzlichen Gabe eines Anthracyclines (z.B. Daunorubicin) an drei Tagen zusammen²⁷. Bei 60-80% der jungen Erwachsenen sowie bei 40-60% der Erkrankten über 60 Jahre kann durch die klassische Induktionstherapie eine CR erreicht werden⁴¹.

In der nachfolgenden Konsolidierungsphase sollen residuelle, d.h. nach der Induktionsphase verbliebene leukämische Blasten eradiziert und somit das Rezidivrisiko gesenkt werden²⁷. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten: die Behandlung des Patienten mit einer mittel- bis hochdosierten Chemotherapie mit Cytarabin über zwei bis vier Zyklen sowie eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT). Die Wahl der Konsolidierungstherapie erfolgt in Abhängigkeit vom ELN-Risikoprofil, dem Patientenalter und bestehender Komorbiditäten sowie der Verfügbarkeit eines geeigneten Stammzellspenders⁴⁰.

Eine Vielzahl an Studien befasst sich zurzeit intensiv mit der Entwicklung neuer Therapeutika. Hierzu zählt unter anderem Midostaurin. So zeigt eine klinischen Phase III Studie, dass mit diesem *FLT3* Inhibitor eine signifikante Verlängerung des durchschnittlichen, Rezidiv-freien

Überlebens von AML Patienten mit FLT3 Mutation erzielt werden kann⁴⁶. Gemtuzumab Ozogamicin (GO) ist ein monoklonaler Calicheamicin gekoppelter anti-CD33 Antikörper der an CD33⁺ myeloische Zellen bindet und dadurch deren Apoptose induziert, wobei dessen Einsatz umstritten ist. Neuere Analysen bestätigen jedoch, dass Patienten mit einem günstigen bis intermediären Risikoprognoseprofil von einer GO Gabe während einer intensiven Induktionstherapie profitieren⁴⁷.

1.4 Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die allogene HSZT ist nach wie vor die effektivste Langzeittherapie für Patienten mit intermediären oder hohen AML Risikoprofil sowie bei therapierefraktärer AML^{48,49}. Obwohl die Anzahl der HSZT jährlich um 10% steigt, können sich nicht alle Patienten dieser Art von Therapie unterziehen. Gründe hierfür sind das Alter des Patienten, Komorbiditäten sowie Toxizität durch vorangegangene Therapien⁴¹. Vor der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen erfolgt eine myeloablative, nicht-myeloablative oder intensitätsreduzierte Konditionierungstherapie, die klassischerweise aus einer Chemotherapie bzw. aus Ganzkörperbestrahlung mit oder ohne Chemotherapie besteht. Die Wahl der Intensität der Konditionierungstherapie richtet sich vor allem nach dem Patientenalter, bestehender Komorbiditäten, dem Remissionsstatus vor der Transplantation sowie dem Rezidivrisiko der AML⁵⁰. Die Konditionierungstherapie dient neben der Induktion einer Immunoablation, welche eine Transplantatabstoßung verhindern soll, der Herstellung einer Knochenmarksnische sowie der Elimination von Leukämiezellen^{51,52}. Die für die allogene HSZT benötigten CD34⁺ Stammzellen können nach G-CSF Mobilisierung aus dem peripheren Blut, direkt aus dem Knochenmark oder seltener aus Nabelschnurblut eines menschlichen allogenen Spenders isoliert werden⁵³. Primär kommen hierfür HLA-identische verwandte sowie unverwandte Spender in Frage. Dabei spielt es für den Erfolg einer allo-HSZT eine große Rolle, inwiefern eine immunologische Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger besteht. Diese wird unter anderem durch die Übereinstimmung der HLA Moleküle von Spender und Empfänger bemessen. So zeigten Studien, dass bei HLA-Klasse I sowie HLA-DR kompatiblen Paarungen (8/8 Kompatibilität) die durchschnittliche Ein-Jahres-Überlebensrate bei 52% liegt. Allein durch die Inkompatibilität eines dieser Allele (7/8 Kompatibilität) nimmt diese um knapp 10% ab⁵⁴.

Den passenden HLA-identen Spender für einen Patienten zu finden, gestaltet sich jedoch oft schwierig. Auf Grund des hohen Polymorphismus existieren 10²³ Genotypen aus den Kombinationsmöglichkeiten zwischen HLA-A, -B, -C, -DR und -DQ⁵⁵. Jedoch ist die Wahrscheinlichkeit, dass manche HLA-Allele mit bestimmten anderen HLA-Allelen

vorkommen sehr hoch. Dieses Phänomen wird Kopplungsungleichgewicht (engl.: *linkage disequilibrium*, LD)⁵⁶ genannt und ist darin begründet, dass bestimmte Genloki, die in direkter Nachbarschaft liegen, in Genblöcken vererbt werden. Außerdem sind einige Kombinationen in manchen ethnischen Gruppen häufiger vertreten als in anderen, so zum Beispiel der in der kaukasischen Bevölkerung häufig vorkommende Haplotyp HLA-A1, -B8, -DR3^{57,58}. Dennoch finden in Europa nur 45-65% der Patienten, je nach Häufigkeit der HLA-Allele bzw. derer Kombinationen, einen unverwandten HLA-A, -B, -C, -DR und -DQ (10/10) identen Spender⁵⁹. Selbst innerhalb der Familie besitzen nur 15-30% der Patienten, je nach Anzahl der Geschwister, einen in beiden Allelen der HLA Loci identen Spender⁶⁰.

1.4.1 *Graft-versus-Leukemia* Effekt und *Graft-versus-Host* Erkrankung

Nach allo-HSZT können durch immunologische Differenzen zwischen Spender und Patienten immunologische Reaktionen zwischen Zellen des Transplantats und Zellen des Patienten sowie umgekehrt auftreten. Diese Reaktionen beeinflussen den Erfolg der allo-HSZT. So können Zellen des Empfängers das Transplantat attackieren und damit zu einer Abstoßungsreaktion beitragen. Dabei wird diese Reaktion hauptsächlich durch T-Zellen und NK-Zellen des Patienten verursacht. Diese erkennen bestimmte Muster, wie allogene HLA-Moleküle und Minor-Histokompatibilitätsantigene (mHAg) sowie nicht-idente KIR Rezeptoren (engl.: *killer cell immunoglobulin like receptor*) auf den Zellen des Spenders. Auch die T-Zellen sowie die NK-Zellen des Transplantats verursachen nach der HSZT durch die Erkennung allogener HLA-Moleküle, mHAg sowie Leukämie-assoziiierter Antigene (LAAs) sowie nicht-identer KIR Rezeptoren eine Reihe immunologischer Reaktionen gegen die Zellen des Patienten^{48,61}. Zu den positiven Effekten dieser Spenderzell-vermittelten Reaktionen gehören zum einen die Kontrolle von vor allem viralen Infektionen nach HSZT, zum anderen die Eradikation von residuellen Leukämieblasten. Durch letzteres wird der seit mehreren Dekaden bekannte therapeutisch wertvolle *Graft-versus-Leukemia* (GvL, Transplantat-gegen-Leukämie) Effekt erzielt, der mit einer Reduktion des Rezidivrisikos einhergeht. Jedoch ist die Erkennung der T-Zellen häufig nicht auf Leukämiezellen beschränkt, sondern kann sich auch gegen Antigene auf gesunden Gewebe des Patienten richten und eine Transplantat-gegen-Empfänger Erkrankung (*Graft-versus-Host Disease*, GvHD) induzieren (Abb. 1.4)⁶².

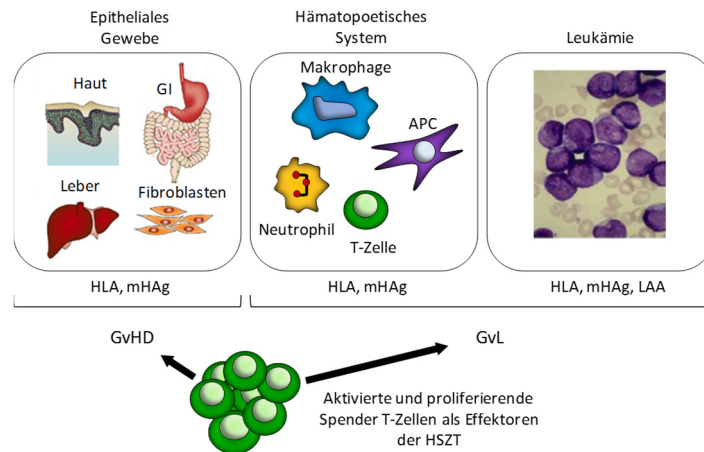


Abb. 1.4.: T-Zellen als Effektoren des GvL Effektes und der GvH Erkrankung. Aktivierte, proliferierende Spender T-Zellen, die durch allo-HSZT in den Patienten transplantiert wurden, können zum einen den sog. GvL Effekt vermitteln. Hierbei erkennen sie Zellen der Hämatopoese des Empfängers anhand allogener HLA Moleküle oder minor-HLA (mHAg) Moleküle. Insbesondere gegen Zellen des gastrointestinalen Traktes (GI), der Leber, der Haut und auf Fibroblasten können dieselben Spender T-Zellen jedoch auch einen z.T. lebensbedrohlichen GvH Effekt vermitteln und damit eine GvH Erkrankung auslösen. Adaptiert nach Bleakley und Riddell⁶³.

Neben Rezidiven ist die GvHD nach wie vor der Hauptgrund transplantationsassoziiierter Morbidität und Mortalität^{64,65}. Ursache hierfür ist u.a. die durch das vorangegangene Konditionierungsregime verursachte Gewebeschädigung des Patienten. Der hierdurch induzierte Entzündungsprozess löst eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems und damit die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (z.B. $\text{TNF-}\alpha$, IL-1) sowie die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen aus. Donor-Lymphozyten erkennen allogene Antigene des Patienten, die durch APZs präsentiert werden und werden aktiviert. Dies führt zu einer Produktion von Zytokinen (z.B. $\text{IFN-}\gamma$, IL-2), was im Anschluss eine Verstärkung der Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Migration von alloreaktiven Spender T-Zellen sowie NK-Zellen verursacht. Diese vermitteln zytotoxische Effekte und schädigen damit das Gewebe des Patienten^{66–70}.

In den letzten Jahrzehnten zielten zahlreiche Untersuchungen darauf ab, dass durch die allogene HSZT verursachte GvHD Risiko sowie das Risiko einer Abstoßungsreaktion zu senken. Dabei spielt die Inhibition der T-Zellen eine große Rolle. So können prophylaktisch immunsupprimierende Medikamente (z.B. Cyclosporin A, Methotrexat) zur Hemmung der Aktivierung und der Proliferation der T-Zellen appliziert werden⁷¹. Es wird aber auch die *in vitro* Depletion von T-Zellen aus dem Stammzellpräparat (z.B. durch die CD34^+ Selektion durch das CliniMACS System) angewandt. Auch die Gabe von *in vivo* T-Zell depletierender Substanzen, wie Cyclophosphamid oder des monoklonalen Antikörpers ATG (engl.: *anti-thymocyte globulin*) erfolgt zur Minimierung des GvHD Risikos⁷². Diese Ansätze haben jedoch gemein, dass durch Immunsuppression oder Depletion der T-Zellen auch die positiven Effekte der HSZT vermindert werden^{73,74}. So sind Patienten aufgrund spät einsetzender Immunrekonstitution anfälliger für Pilz- und Virus-Infektionen. Zu diesen zählt die

Reaktivierung latenter Infektionen mit Cytomegalie-, Herpes Simplex-, Epstein-Barr-, und Varicella Zoster-Viren, welche zur Transplantations-assoziierten Mortalität beitragen können⁷⁵. Außerdem haben diese Patienten eine höhere Inzidenz für ein Transplantatversagen und besitzen ein erhöhtes Rezidiv-Risiko^{74,76}. Eine Möglichkeit den GvL Effekt nach T-Zell depletierter HSZT gezielt wiederherzustellen, ist die zeitlich versetzte Gabe von unselektierten, polyklonalen Spenderlymphozyten (Donor Lymphozyten Infusion, DLI)⁷⁷. Da diese Spenderlymphozyten in der Regel zu einem späteren Zeitpunkt nach HSZT appliziert werden, an welchem die durch die Konditionierungstherapie verursachte Entzündungsreaktion abgeklungen ist, kann das T-Zell assoziierte GvHD Risiko reduziert werden. Studien zeigten jedoch, dass die unselektierte DLI nach wie vor mit einem großen GvHD Risiko einhergeht und auch bei der Therapie einer rezidivierenden AML keine Vorteile aufweist^{64,76,78,79}.

1.4.2 Wege zur Verbesserung der GvL Reaktivität bei zeitgleicher Reduktion der GvHD Inzidenz

Eine der größten Herausforderung der allo-HSZT bleibt nach wie vor die Verbesserung des GvL Effektes bei zeitgleicher Kontrolle der GvHD. Strategien zur Separation beider Effekte sollen im Folgenden diskutiert werden.

1.4.2.1 Die Rolle von CD4⁺ T-Zellen

Ein großer Teil der Forschungen in der Tumorummunologie beschäftigt sich mit Tumorspezifischen zytotoxischen Lymphozyten (CTL, engl.: *cytotoxic T-Lymphocyte*), welche direkte Lyse von Tumorzellen vermitteln können. Diese sind klassischerweise in der Gruppe der CD8⁺ T-Zellen zu finden¹. Daher sind CD8⁺ T-Zellen für den anti-leukämischen Effekt der HSZT oder DLI von großer Bedeutung. Auch die Rolle der CD4⁺ T-Zellen als Bestandteil der Tumorummunologie wird zunehmend größer. Denn diese T-Zell-Population kann nicht nur zytotoxische CD8⁺ T-Zellen unterstützen, sondern besitzt selbst ein großes anti-leukämisches Potential^{80,81}. So zeigten experimentelle Studien nicht nur, dass CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen ein stärkeres anti-Tumorpotential aufweisen⁸², sondern auch dass sich die Leukämieaktivität in einer Kultur mit CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen aus den CD4⁺ T-Zellen herleiten lässt^{83,84}. Auch in Bezug auf das Risiko der Induktion einer GvHD nach HSZT oder DLI scheinen CD4⁺ T-Zellen über ein besseres Sicherheitsprofil zu verfügen^{76,85}. Grund hierfür ist die Interaktion der T-Zell-Populationen mit definierten HLA-Klassen Molekülen. Wie beschrieben, binden CD8⁺ T-Zellen an HLA-Klasse I Moleküle, die konstitutiv auf der Oberfläche aller nukleären Zellen exprimiert werden. Auf diese Weise können durch DLI oder HSZT transferierte CD8⁺ Spender-Zellen allo-Antigene im Kontext von HLA-Klasse I

Molekülen auf nicht-hämatopoetischen Gewebezellen erkennen, diese damit zerstören und so eine schwere GvHD induzieren^{80,86}. Studien zeigten, dass durch den Einsatz CD8⁺ depletierter Transplantate oder Spender Lymphozyten sowie durch die Vermeidung von HLA-Klasse I Inkompatibilitäten bei der HSZT eine Reduktion der Inzidenz sowie der Intensität der GvHD erzielt werden kann⁸⁷⁻⁹⁰. CD4⁺ T-Lymphozyten interagieren dagegen mit HLA-Klasse II exprimierenden Zellen. Dazu zählen Zellen der Hämatopoese sowie Leukämiezellen, jedoch unter inflammatorischen Bedingungen auch nicht-hämatopoetische Gewebezellen⁹¹. Unter nicht inflammatorischen Verhältnissen werden damit keine Zielzellen der GvH Reaktivität erkannt. Somit besitzen HLA-Klasse II restringierte T-Zell-Populationen im Gegensatz zu CD8⁺ T-Lymphozyten ein geringeres Potential eine GvHD zu induzieren.

1.4.2.2 Die Rolle von Zielantigenen der T-Zell-Reaktivität

Ein Weg, die Trennung von unerwünschten GvH und erwünschten GvL Effekten zu erzielen, besteht im adoptiven Transfer von T-Zellen mit definierter Spezifität. Hierfür muss zunächst ein Antigen identifiziert werden, welches sich zur Induktion eines selektiven GvL Effektes qualifiziert. Potentielle Zielstrukturen sollten ausschließlich oder präferentiell auf Zellen der Leukämie bzw. Hämatopoese zu finden sein, ohne oder nur in geringem Maße auf normalem Gewebe exprimiert zu werden⁶³. Im Weiteren sollte das Antigen stabil exprimiert werden und im besten Fall für das Überleben der Leukämiezelle relevant sein, sodass dessen Herunterregulation unwahrscheinlich ist. Zu diesen zählen Leukämie-assoziierte sowie Leukämie-spezifische Antigene und Minor-Histokompatibilitätsantigene. Aber auch HLA-Moleküle, wie HLA-DPB1 können eine wichtige Rolle als Zielantigen der GvL Reaktivität von T-Zellen spielen.

Leukämie-assoziierte und Leukämie-spezifische Antigene. Hierzu zählen von Leukämiezellen überexprimierte oder in mutierter Form präsentierte Genprodukte, die auf normalen Zellen kaum bzw. nicht exprimiert werden (z.B. das PR-1 Epitop der Proteinase 3⁹², Wilms' Tumor Protein 1⁹³, RHAMM⁹⁴). Leukämie-spezifische Antigene sind sehr selten und werden ausschließlich in Leukämiezellen exprimiert⁹⁵. Zu ihnen zählen sogenannte Neoantigene, die als Produkte von Translokationen (BCR/ABL) oder Mutationen (FLT3-ITD) entstehen^{96,97}.

Minor-Histokompatibilitätsantigene. Minor-Histokompatibilitätsantigene (mHAgs) gelten als Zielstrukturen der Antigen-spezifischen Immuntherapie in der Leukämie⁹⁸. Diese außerhalb des HLA Locus liegenden Gene kodieren für Peptide aus polymorphen Regionen endogener Proteine, die über HLA Moleküle präsentiert werden. Die Aminosäuresequenz-Variationen dieser Peptide spielen als allogene Differenz bei der Vermittlung des GvL, aber auch des GvHD

Effektes, eine wichtige Rolle. Werden mHAgS jedoch nur von hämatopoetischen Zellen, wie den Leukämiezellen exprimiert, so kann durch den Transfer von mHAg-spezifischen T-Zellen ein selektiver GvL Effekt verursacht werden (z.B. HA-1, HA-2)⁹⁹.

HLA-DP als Zielantigen der GvL Reaktivität. Wie bereits beschrieben, spielen HLA-Klasse I und II Moleküle in der allogenen HSZT bei der Auswahl eines geeigneten Spenders, aber auch für das Maß des GvL und GvH Effektes eine besonders kritische Rolle. Dies liegt darin begründet, dass die Frequenz des Auftretens einer akuten GvHD direkt mit dem Grad der HLA Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger korreliert^{54,100,101}. Dass die transplantationsassoziierte Mortalität von Patienten mit nur teilweise HLA-identen Spendern mit jedem nicht identen Allel zunimmt, ist aber nicht für alle Allel HLA Inkompatibilitäten der Fall. So beschrieben Fürst und Kollegen 2013, dass ein Unterschied zwischen Patienten und Spender in einem der beiden HLA-DQB1 Allelen bei ansonsten kompatiblen Spender nicht mit einer erhöhten Mortalität verbunden ist¹⁰². Auch manche HLA-DP Konstellationen scheinen keinen Einfluss auf die Gesamtmortalität nach allogener HSZT zu haben und sollen daher im Folgenden genauer betrachtet werden¹⁰³.

HLA-DP ist ein heterodimeres HLA-Klasse II Molekül, welches auf Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird. Es besteht aus einer α - und einer β -Kette, welche durch die Gene *HLA-DPA1* und *DPB1* kodiert sind. Zurzeit sind 20 *DPA1* und 447 *DPB1* Allele bekannt, wobei nur 3 HLA-DPA1 und 12 HLA-DPB1 Proteine mit einer Frequenz von mehr als 1% in der kaukasischen Bevölkerung vertreten sind. Das am häufigsten vorkommende HLA-DPB1 Molekül ist hierbei HLA-DPB1*04:01 (Abb. 1.5)¹⁰⁴.

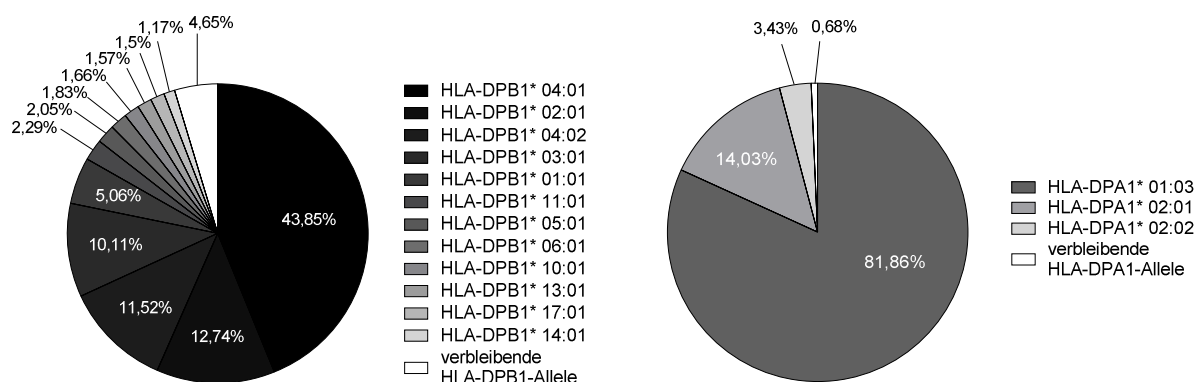


Abb. 1.5.: HLA-DPB1 und -DPA1 Allel Frequenzen in der kaukasischen Bevölkerung. Wahrscheinlichkeit des Vorkommens bestimmter HLA-DP Allele nach Hollenbach und Kollegen¹⁰⁴.

Die Genloki *HLA-DPA1* und *-DPB1* werden untereinander mit einem starken Kopplungsungleichgewicht vererbt. Dagegen besteht bei der Vererbung zwischen *HLA-DP* und *HLA-A*, *-B*, *-C* sowie *HLA-DR* und *-DQ*, auf Grund eines rekombinanten *Hotspots* zwischen

HLA-DP und den restlichen HLA-Klasse II Genen, kaum ein Kopplungsungleichgewicht^{56,105,106}. Deshalb sind nur 5% der verwandten Spender HLA-DP inkompatibel, während bei unverwandten Spendern bis zu 80% HLA-Inkompatibilitäten auftreten, die ansonsten HLA kompatibel (10/10) zum Patienten sind¹⁰⁷. Dass HLA-DP Inkompatibilitäten einen Einfluss auf das Ergebnis nach HSZT haben, konnten verschiedene Forschergruppen beobachten^{108–111}. So konnte in großen klinischen Studien gezeigt werden, dass HLA-DPB1 Inkompatibilitäten mit sowohl GvH als auch GvL Effekten assoziiert sind^{54,112}. Ein statistischer Unterschied der Gesamtmortalität von HLA-DPB1-inkompatiblen zu -kompatiblen HSZT konnte nicht registriert werden. Dies könnte in dem ausgleichenden Effekt zwischen einer erhöhten GvHD Inzidenz und einer reduzierten Rezidivrate begründet sein. Bestimmte HLA-DPB1 Inkompatibilitäten waren sogar mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert^{108,113}. Nach neueren Studien werden daher HLA-DP Inkompatibilitäten in sog. permissive und nicht permissive Inkompatibilitäten eingeteilt. Permissive Inkompatibilitäten werden bei HSZT bei ansonsten HLA-identen (10/10) Spender-Patienten-Konstellationen gut toleriert, dagegen sind nicht-permissive Inkompatibilitäten mit einem erhöhten GvHD Risiko assoziiert^{108,109,114,115}. Die molekularbiologischen Gründe für die Einteilung der HLA-DP Inkompatibilitäten in permissiv und nicht-permissiv sind zurzeit verstärkt im Fokus der Wissenschaft. So entwickelten Fleischhauer und Mitarbeiter eine Einteilungsmöglichkeit basierend auf der Einordnung der Immunogenität allo-reaktiver T-Zell-Epitope (TZE) in drei verschiedene Gruppen. Bei permissiven Inkompatibilitäten gehören die HLA-DP Allele von Spender und Patient der gleichen TZE Gruppe an, während nicht permissive Inkompatibilitäten aus verschiedenen TZE Kategorien stammen und daher bei der Spenderauswahl vermieden werden sollten¹¹⁶. Darüber hinaus zeigte die Arbeitsgruppe von Petersdorf und Kollegen, dass das Vorkommen eines Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) in der 3'UTR des *HLA-DP* Genoms das Expressionslevel definierter HLA-DP Antigene bestimmt. So ist eine HSZT bei einer HLA-DP-inkompatiblen aber ansonsten HLA-kompatiblen Spender-Patienten-Konstellation mit einem erhöhten GvHD Risiko assoziiert, wenn die Zellen des Patienten ein hohes HLA-DP Expressionslevel, die des Spenders dagegen ein niedriges Level aufweisen¹¹⁷.

Für einige der potentiellen Leukämie-spezifischen und –assozierten Antigene konnten bereits *ex vivo* autologe oder allogene Antigen-spezifischen Lymphozyten für den adoptiven T-Zell-Transfer identifiziert und selektioniert sowie *in vitro* generiert werden¹¹⁸. Um eine für die klinische Anwendung notwendige T-Zell-Zahl zu generieren, erfolgt nach Isolation einer Antigen-spezifischen T-Zell-Population deren Expansion. So können T-Zellen beispielsweise

durch die Kultivierung mit bestrahlten Tumorzellen oder mit Antigen beladenen, bestrahlten APZ Lymphozyten Antigen-spezifisch stimuliert und expandiert werden^{90,115,119}. Die hierfür nötige Langzeitkultivierung beeinflusst jedoch die Funktionalität der T-Zellen. So nimmt nach mehrmonatiger *in vitro* Stimulation und Expansion die Leukämie-reaktive Wirkung der T-Zellen durch terminale Differenzierung ab, so dass der anti-leukämische Effekt nicht mehr in ausreichender Intensität erzielt werden kann^{120–122}. Zudem ist die Generierung und Kultivierung dieser T-Zellen mit hohem Kosten- und Zeitaufwand verbunden¹²³. Um die Verfügbarkeit einer großen Anzahl von T-Zellen mit gewünschter Spezifität für den adoptiven T-Zell-Transfer innerhalb kürzester Zeit zu gewährleisten und zu beschleunigen, könnten Lymphozyten genetisch in der Art modifiziert werden, dass sie einen TZR mit eben jener Reaktivität exprimieren.

1.5 Die TZR-Therapie

Steinmetz und Kollegen waren im Jahre 1986 die Ersten, die zeigen konnten, dass die Spezifität einer T-Zelle durch den Transfer von TZR-Genen umprogrammiert werden kann¹²⁴. In den folgenden Jahren sollte diese eher zufällig gemachte Entdeckung zunächst den Weg für die *in vitro* Funktionalitätstestung Tumor-spezifischer TZR und infolgedessen die *in vivo* Testung Virus-spezifischer Rezeptoren gegen Influenza ebnen^{125,126}. Während expandierte, genetisch modifizierte TZR T-Zellen bereits klinische Erfolge in Melanom und in anderen Krebsarten zeigten, sind nur wenige klinische Daten zum Potential dieser T-Zellen in der AML verfügbar. Nichtsdestotrotz wurden einige TZR, wie der TZR gegen das HLA-A2 restringierte Epitop von HA-1 oder WT-1, extensive in vorklinischen Studien getestet und werden zur Zeit in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit analysiert¹²⁷.

Basis für die Generierung einer TZR modifizierten T-Zelle für die Leukämieforschung sind monoklonale Leukämie-reaktive T-Zell-Klone. Aus diesen Zellen können die Sequenzen der α - und β -Kette des spezifischen TZR isoliert und in T-Zellen gesunder Spender eingebracht werden, wodurch diese Zellen eine neue Spezifität erhalten (Abb. 1.6)¹²⁸.

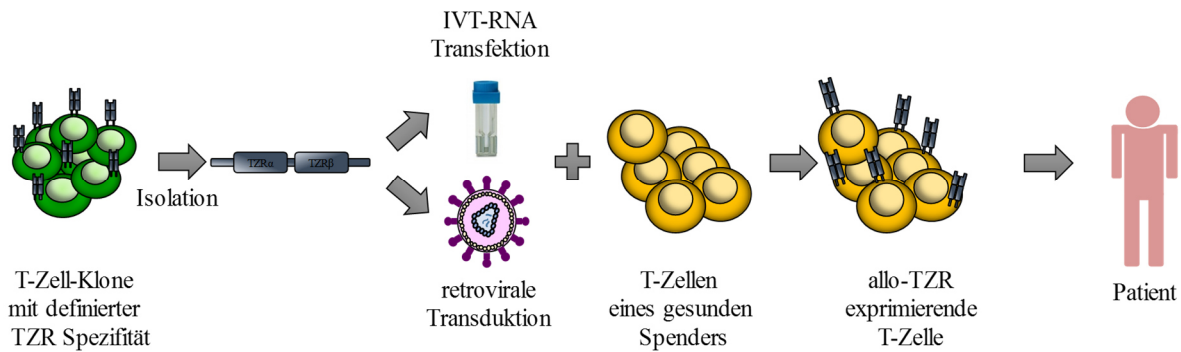


Abb. 1.6.: Die adoptive TZR-Therapie im Überblick. Aus Antigen-spezifischen T-Zell-Klone können TZR-Gensequenz isoliert werden. Die Einbringung in die Spender T-Zelle erfolgt anschließend entweder durch eine stabile retrovirale Transduktion oder transient mittels Elektroporation mit *in vitro* transkribierter RNA. Spender T-Zellen mit dem TZR gewünschter Spezifität können dann in den Patienten transfundiert werden.

Bei der Einbringung der TZR in die Spender T-Zelle können unter anderem zwei Übertragungsmethoden unterschieden werden. Klassischerweise werden TZR-Gensequenzen mittels retroviraler oder lentiviraler Transduktion stabil in das Genom der T-Zelle integriert. Das am häufigsten verwendete Virus zur Konstruktion retroviraler Vektoren ist auf Grund der hohen Transduktionseffizienz das murine Moloney Leukämievirus (MMLV), welches zur Gattung der Gammaretroviren gehört¹²⁹. Auf Basis des MMLV wurde der retrovirale Expressionsvektor pMX-IRES-Puro entwickelt. Dieser verfügt neben der Klonierungsstelle zur Integration von TZR-Gensequenzen über ein Resistenz-Gen zur Selektion transduzierter T-Zellen (Puromycin) sowie das Signal Ψ zur Verpackung der genomischen, viralen RNA in Viruspartikel durch eine Verpackungszelllinie. Alle drei Domänen werden durch die 5'- und 3'-LTR (engl.: *long terminal repeats*) flankiert, welche die Expression der eingebrachten Gene steuern¹³⁰.

Bei dem Einsatz von retroviralem Gentransfer besteht jedoch immer die Gefahr, dass die Integration der Gene im humanen Genom an der falschen Stelle, beispielsweise in der Promotorregion andere Gene, stattfindet. Hierbei können Insertionsmutationen entstehen, welche die Aktivierung zellulärer Onkogene oder die Änderung der Transkriptionsaktivität anderer regulatorischer Gene induzieren und in Folge dessen zur Entartung von Zellen und damit zur Tumorbildung beitragen^{131,132}. Zusätzlich kann die stabile Integration der Rezeptorgene in die T-Zellen ohne weitere Sicherheitsmechanismen zu einer andauernden *off-target* Reaktivität führen, also einer Reaktion der modifizierten T-Zelle gegenüber einem anderen, nicht als Zielstruktur vorhergesehenen Antigen¹³³.

Um diese Risikofaktoren zu umgehen, können TZR-Gene auch temporär in die Zelle eingebracht werden^{134–136}. Hierfür wird *in vitro* transkribierte, polyadenylierte RNA, welche für die jeweiligen TZR-Sequenzen kodieren, mittels Elektroporation in das Zytoplasma der Zelle transferiert. Dort kann diese sofort zu einem Protein translatiert und an der Zelloberfläche

exprimiert werden, wo es je nach Konstrukt mehrere Tage verbleibt. *In vitro* Studien zeigten, dass die Funktionalität der so veränderten T-Zelle einer retroviral transduzierten T-Zelle gleicht¹³⁷. *In vivo* Studien bestätigen die therapeutische Wirksamkeit in der Maus¹³⁸. Vorteile dieser Methode sind zum einen die Vermeidung maligner Transformationen durch das Ausbleiben der Integration des Genes in das Genom. Zum anderen treten schwerwiegende TZR vermittelte Nebeneffekte nur kurzzeitig auf. Nachteilig ist jedoch die Möglichkeit, dass eine Dosis TZR-RNA transfizierter T-Zellen nicht zur vollständigen Eradikation der leukämischen Blasten führt und die in so einem Fall notwendige repetitive Gabe im Falle von allogenen Spender T-Zellen das Alloreaktivitätspotential erhöhen würde^{139,140}.

1.5.1 Optimierung der TZR-Therapie

Ersten klinische Studien zur Effektivität von TZR genmodifizierten T-Zellen gegen das HLA-A2-restringierte Peptid MART-1₂₇₋₃₅ zeigten zwar die Wirksamkeit dieser Therapie, jedoch sprachen nur 13% der Patienten mit metastasierenden Melanom auf die Behandlung an. Trotz hoher Transduktionseffizienzen waren kaum T-Zellen mit neuer Spezifität im Patienten detektierbar¹⁴¹. Gründe, die für die niedrige Funktionalität eines exogen eingebrachten TZR sprechen, können vielfältig sein. Hierzu zählen unter anderem sog. *Immunescape* Mechanismen, durch die sich eine Tumorzelle der Erkennung durch eine Immunzelle entziehen kann, aber auch die Expressionsstärke des Tumorantigens, die Anwesenheit des endogenen TZR und eine niedrige Affinität des TZR. Dabei beschreibt die Affinität die Stärke der monomeren Bindung des TZR zu seinem Antigen, während die Summe dieser Affinitäten sowie das Level der TZR-Expression die Avidität der T-Zelle definiert. Optionen zur Verstärkung der Avidität von T-Zellen mit eingebrachtem TZR werden immer zahlreicher und können in die drei Punkte eingeteilt werden¹⁴²:

Verstärkung der TZR-Expression. Zur Verstärkung der TZR-Expression wurden zahlreiche Methoden entwickelt. Hierzu zählt zum einen die Kodonoptimierung der TZR-Sequenzen. Hierbei werden selten genutzte Kodons, unter Beibehaltung der natürlichen Aminosäurenabfolge, ausgetauscht und durch häufiger im Menschen auftretende ersetzt, wodurch die TZR-Expression erhöht werden kann¹⁴³. Aber auch die Vermeidung einer sog. Fehlpaarung zwischen exogen eingebrachten TZR- und den natürlich vorkommenden TZR-Ketten ist essentiell für eine starke Expression des eingebrachten Rezeptors. Eine solche Fehlpaarung kann jedoch nicht nur der Grund für eine reduzierte Oberflächenexpression sein, sondern auch eine mögliche Ursache für *off-target* Reaktivitäten gegen normales, gesundes Gewebe¹³³. Sequenzmodifikationen beider Ketten können helfen, das Auftreten von

Fehlpaarungen zu vermindern, die Dimerisierung des eingebrachten TZR zu stabilisieren und damit die TZR-Expression zu erhöhen. Zu diesen Modifikationen gehört die von Sommermeyer und Mitarbeiter gezeigte Minimalmurinisierung. Hierbei werden bestimmte, humane Aminosäuren in der konstanten Domäne des TZR gegen murine Aminosäuren ausgetauscht. Dies führt zur Verbesserung der Oberflächenexpression sowie zur stärkeren Dimerisierung der genetisch veränderten TZR¹⁴⁴. Aber auch die Einbringung einer zusätzlichen Disulfidbrücke zwischen der α - und der β -Kette des exogenen TZRs führt zur Erhöhung der Oberflächenexpression sowie Stabilisierung des eingebrachten Heterodimers. Dieser Ansatz beruht darauf, dass die Interaktion der exogenen Domänen der TZR-Ketten generell sehr schwach ist und die natürlich vorkommenden Disulfidverbindungen die Heterodimerbildung zwischen beiden Ketten nicht signifikant unterstützt^{145–147}. Anstatt mit endogenen Ketten assemblieren die exogenen TZR-Ketten durch die zusätzliche Disulfidbrücke präferentiell miteinander. Konkurrenz um den nur in limitierter Menge vorhandenen CD3 Komplex und Komponenten der Translationsmaschinerie spielen bei der Expression des eingebrachten TZR eine große Rolle¹⁴². Die Einbringung zusätzlicher CD3 Komplexe durch Kotransfektion trägt positiv zur Oberflächenexpression des eingebrachten TZRs bei. Auch eine Kodonoptimierung der TZR-Sequenzen trägt zu einer gesteigerten Rezeptorexpression bei¹⁴³. Hierbei werden selten genutzte Kodons ausgetauscht und durch häufiger im Menschen auftretende ersetzt, wobei jedoch die Aminosäurenabfolge nicht verändert wird.

Optimierung der Antigenbindung. Um die Antigenbindung zwischen TZR und pHLA zu optimieren, können verschiedene Strategien verfolgt werden. Auf Grund der negativen Selektion im Thymus sowie der Induktion der Toleranz nach Kontakt mit peripher im Körper vorkommenden Antigenen, sind T-Zellen mit einer hohen Avidität gegenüber einem bestimmten Antigen sehr begrenzt vorhanden. Daher wurden verschiedene Methode entwickelt um hoch-avide T-Zell-Klone zu generieren. Hierzu zählt unter anderem die Immunisierung transgener, humanisierter Mäuse mit Tumor-assoziierten Peptiden oder auch die *in vitro* Stimulation von T-Zellen mit Tumor-assoziierten Peptiden beladenen Zellen^{142,148–151}. Zum anderen kann durch eine Affinitätsreifung, wie durch die Bakteriophagen Display Technik, die Antigenbindung optimiert werden¹⁵².

Verbesserung der Signaltransduktion. Die Verbesserung der Signaltransduktion dient der Steigerung der Sensitivität der T-Zellen für ein bestimmtes Antigen. TZR besitzen natürlicherweise Glykosylierungen, welche die TZR-Expression senken sowie dessen Internalisierung fördern. Durch die Deletion von vier bis fünf N-Glykosylierungen in der

konstanten Domäne des TZR kann die Sensitivität der TZR transferierten T-Zelle gesteigert werden^{153,154}. Außerdem können Moleküle, die am TZR-Signalweiterleitungsprozess beteiligt sind, genetisch so verändert werden, dass ihre Resistenz gegen einen Abbau zunimmt und so die T-Zell-Funktion verstärkt wird.

1.6 Zielsetzung

In den letzten Jahren rückte das HLA-Klasse II Molekül HLA-DPB1 als potentielle Zielstruktur eines selektiven GvL Effektes immer stärker in den Fokus der Wissenschaft. Gründe hierfür waren zum einen, dass bestimmte (permissive) HLA-DPB1 Inkompatibilitäten, welche in 80% der HSZT mit unverwandten Spender vorkommen, mit signifikant niedrigeren Rezidivraten im Vergleich zu HLA-DPB1 kompatiblen Konstellationen assoziiert waren, ohne dabei das GvHD Risiko zu erhöhen. In vorangegangenen Doktorarbeiten wurden daher T-Zell-Klone generiert, die sowohl *in vitro* als auch im humanisierten Mausmodell *in vivo* in der Lage waren einen anti-leukämischen HLA-DPB1-spezifischen Effekt zu vermitteln. Da die Generierung von Antigen-spezifischen T-Zellen für die klinische Applikation jedoch sehr kosten- und zeitintensiv ist und die Funktionalität der T-Zellen durch eine Langzeitkultur sinkt, sollte in dieser Arbeit gezeigt werden, ob sich die Leukämie-reaktiven Eigenschaften dieser T-Zell-Klone mittels TZR-Transfer auf T-Zellen gesunder Spender übertragen lassen. Durch *in vitro* Testungen sollte dabei zunächst untersucht werden, in wie weit sich die HLA-DP gerichtete Spezifität und Leukämieaktivität der Klone durch den Transfer einzelner TZR in sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen einbringen lässt. Um eine stärkere Oberflächenexpression der TZR transfizierten T-Zellen zu erreichen, wurden verschiedene Modifizierungsstrategien (Kodonoptimierung, Murinisierung, Einbringen einer zusätzlichen Disulfidbrücke) überprüft. Da beim Transfer HLA-DP-spezifischer T-Zellen unter inflammatorischen Bedingungen, wegen der hochregulierten Expression von HLA-DP auf Gewebezellen potentiell die Gefahr der Induktion einer schwerwiegenden GvHD besteht, sollte die T-Zell-Reaktivität gegenüber verschiedenen Gewebezellen untersucht werden. Letztendlich sollte mittels *in vivo* Analysen getestet werden, ob TZR transduzierte T-Zellen in der Lage sind, primäre Leukämieblasten im NSG Maussystem zu eradizieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das zur Generierung HLA-DP-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Klone verwendete Protokoll dahingehend modifiziert, dass CD4⁺ T-Zellen unter CD4 Korezeptor-blockierenden Bedingungen stimuliert werden. Hierdurch sollten präferentiell CD4 Korezeptor-unabhängige T-Zell-Populationen generiert werden, mit dem Ziel TZR aus diesen T-Zell-Populationen auch zur Umprogrammierung von CD8 T-Zellen nutzen zu können. Generierte T-Zell-Populationen sollten auf Spezifität, Klonalität, HLA-Abhängigkeit,

CD4 Korezeptorabhängigkeit sowie Effektorfunktion gegen verschiedene hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zellen analysiert werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 2.1.: Verwendete Geräte

Name	Hersteller, Standort
Autoklav (Varioklav Dampfsterilisator Typ 75S)	HP Medizintechnik GmbH, Deutschland
BD FACS Calibur	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
Eismaschine (AF 20)	Scotsman Ice Systems, USA
Elektrophorese Kammer und Zubehör	Neolab, Deutschland
ELISpot Reader	Cellular Technology Limited, USA
Gefrierschrank (Forma 900 Series, -80°C)	Thermo Fisher Scientific, USA
Gene Pulsar Xcell™ Electroporation System	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Heizblock ThermoMixer C mit Thermo Top®	Eppendorf AG, Deutschland
Inkubationsschrank Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific, USA
Kühl-/ Gefrierschrankskombination (+4°C/-20°C)	Liebherr, Deutschland
Magnetrührer (HR Hei-Standard, MR Hei-Mix L)	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Deutschland
Mikrowelle (MW2235CB)	Bomann, Deutschland
Milli-Q Q-Pod® Reinstwasseraufbereitungsanlage	Merck Millipore, USA
MiSeq	Illumina, USA
Membranvakuum Pumpe (VP86)	VWR International, USA
Netzgerät (EV231)	Consort GmbH, Belgien
PCR-Gerät (Mastercycler® Nexusgradient)	Eppendorf AG, Deutschland
Pipettierhelfer (Pipetboyacu, Pipetboyacu 2)	Integra Biosciences AG, USA
Pipetten ErgoOne (0,5-10µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl)	Starlab GmbH, Deutschland
Research Plus (0,5-10µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl)	Eppendorf AG, Deutschland
ErgoOne Mehrkanalpipette (30-300µl)	Starlab GmbH, Deutschland
Präzisionswaage (Kern PCB 3500g)	Kern & Sohn GmbH, Deutschland
PrimoVert	Carl Zeiss AG, Deutschland
Sterilbank (Safe 2020)	Thermo Fisher Scientific, USA
Stickstofftank (MVE HECO Series 800-190)	German-cryo® GmbH, Deutschland
TopCount® NXT™	PerkinElmer Inc., USA
Typhoon 9200	GE Healthcare, England
Vortex VV3	VWR International, USA
Wärmebad Typ 1003	GFL GmbH, Deutschland
Zentrifugen Tischzentrifuge (5424R)	Eppendorf AG, Deutschland
Megafuge (16R)	Thermo Fisher Scientific, USA
Megafuge (40R)	Thermo Fisher Scientific, USA
Mirkozentrifuge (C1301B-230V)	Labnet, USA

2.1.2 Verbrauchsgüter & Equipment

Tab. 2.2.: Verwendete Verbrauchsgüter und Equipment

Name	Hersteller, Standort
Abdeckplatte PS (9mm Profil)	Greiner bio one GmbH, Deutschland
Einfrierbox CryoSafe™	Neolab, Deutschland
Elektroporationsküvetten (4mm)	PEQLAB, Deutschland
ELISpotplatten (MultiScreen _{HTS} -Filtrationsplatten)	Merck Millipore, USA
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
Handschuhe Nitrilhandschuhe	Kimberly-Clark, USA
Versa Touch Handschuhe	Ansell, Österreich
Kryotubes (Cryo.s™ 2ml)	Greiner bio one GmbH, Deutschland
Kanülen Sterican® Ø 0.40 x 12mm 27G x 1/2"	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Sterican® Ø 0.40 x 19mm 27G x 3/4"	
LumaPlate-96	PerkinElmer Inc., USA
MACS MultiStand	MiltenyiBiotec GmbH, Deutschland

MACS PreSeparation Filter	MiltenyiBiotec GmbH, Deutschland
MACS Separation Columns LS	MiltenyiBiotec GmbH, Deutschland
Petrischalen (P10, P15)	Greiner bio one GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Deutschland
Tip One 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Biozym, Deutschland
Gestopft: Safe Seal Tips 10µl	Starlab GmbH, Deutschland
Gestopft: Tip One 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Deutschland
(Safe Lock Tubes (0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml), Safe LockBiopur® Tubes (0,5ml, 1,5ml))	
Sezierbesteck	Carl-Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Instrumentenschale 160x100x30mm	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Mikroskopierpinzette abgewinkelt 100mm,	
Anatomische Pinzette fein 125mm,	
Fadenschere gerade spitz/spitz 110mm,	
Gefäßschere 1 Blatt geknöpft 120mm,	
Chirurgische Pinzette 130mm	
Serologische Pipetten (5ml, 10ml 25ml, 50ml)	Greiner bio one GmbH, Deutschland
Spritze (5ml, 10ml)	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
Sterilfiltereinheiten	Merck Millipore, USA
Stericup Express plus 0.22µm	
Stericup Durapore 0.45µm	
Zellkulturflaschen (Cellstar® 25cm ² , 75cm ² , 175cm ²)	Greiner bio one GmbH, Deutschland
Zellkulturplatten (48-, 24-, 12-, 6-Lochplatte Flachboden, 96-Lochplatte Flach-, Rund, Spitzboden)	Greiner bio one GmbH, Deutschland
Zellsiebe (100µm)	Corning Inc., USA
Zentrifugationsröhrchen	Greiner bio one GmbH, Deutschland
Cellstar® Polypropylen Röhrchen (15ml, 50ml); Polypropylen Röhrchen 14ml	
Corex Gläser mit Gummiadaptor	Kimble, USA
Zählkammer Neubauer improved bright-line depth 0,1mm	Paul Marienfeld GmbH, Deutschland

2.1.3 Chemikalien & Reagenzien

Tab. 2.3.: Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Name	Hersteller, Standort
2-Mercaptoethanol	Carl-Roth GmbH & Co KG, Deutschland
2-Propanol Rotipuran®	Carl-Roth GmbH & Co KG, Deutschland
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) Tabletten	Sigma-Aldrich® Life Science, USA
Agar-Agar	Carl-Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Ampicillin	Carl-Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Aqua dest.	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
BD Cytotfix/Cytoperm™ Solution	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
BD FACS™ Cleaning Solution	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
BD FACS™ Flow Sheath Fluid	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
BD FACS™ Rinse Solution	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich® Life Science, USA
Chromium-51 Radionukleotid	PerkinElmer, Inc., USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich® Life Science, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO), BioScience-Grade	Carl-Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich® Life Science, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Deutschland
Essigsäure	Sigma-Aldrich® Life Science, USA
Ethanol >99,8%	Carl-Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Formaldehyd (37%)	Sigma-Aldrich® Life Science, USA
H ₂ O ₂ (30%)	Sigma-Aldrich® Life Science, USA
Hefeextrakt	Carl-Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Heparin-Natrium	Rotexmedica, Frankreich
Glycerin	Carl-Roth GmbH & Co KG, Deutschland
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich® Life Science, USA
Pancoll Zellseparationslösung	PAN-Biotech GmbH, Germany
PBS-Trockensubstanz	Biochrom GmbH, Deutschland

RNase Zap®
 TransIT®-LT1
 Trypan Blau
 Trypsin-EDTA
 Trypton/Pepton
 Tween 20
 Xylencyanol

Sigma-Aldrich® Life Science, USA
 Mirus Bio, USA
 Biochrom GmbH, Deutschland
 Gibco®, USA
 Carl-Roth GmbH & Co KG, Deutschland
 AppliChem, Deutschland
 Carl-Roth GmbH & Co KG, Deutschland

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tab. 2.4.: Puffer und Lösungen mit Anleitung zur Herstellung

Name	Zusammensetzung
ELISpot Acetat Puffer	615,8ml ddH ₂ O + 1,8g Natriumacetat + 9,2ml Essigsäure 99%
ELISpot AEC Lösung	20mg AEC (1 Tablette) + 2,5ml DMF + 47,5 ml ELISpot Acetat Puffer Steril filtriert (0,45 µm)
PBS (1x)	95,5g PBS Trockensubstanz ad 10l ddH ₂ O
ELISpot Puffer für sekundären Antikörper	PBS (1x) + 0,5% BSA Steril filtriert (0,22µm)
ELISpot Wasch Puffer	PBS + 0,05% Tween 20
FACS Fixierlösung	PBS +1% Formaldehyde
FACS Puffer	PBS + 0,1% FCS
MACS Puffer	PBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA Steril filtriert (0,22µm)
FACS Sortierungspuffer	PBS + 1% HS + 2mM EDTA Steril filtriert (0,22µm)
TAE-Buffer (50x)	121g Tris Base + 22ml Essigsäure (99%) + 50ml 0.5M EDTA (pH 8,3) ad. 500ml
6x LoadingDye	25mg Bromphenolblau + 25mg Xylencyanol FF + 3,3ml Glycerol + 6,7ml ddH ₂ O

2.1.5 Zusätze

Tab. 2.5.: Medienzusätze

Name	Hersteller, Standort
Fetales Kälber Serum (engl.: <i>fetal calf serum</i> ; FCS, hitzeinaktiviert (56°C, 30min), steril filtriert (0,22µm))	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Hepes Puffer (1M)	Sigma-Aldrich® Life Science, USA
L-Glutamin	Gibco®, USA
Penicillin- Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco®, USA
nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	Lonza Walkersville, Inc., USA
Humanserum (HS, hitzeinaktiviert (56°C, 30min), steril filtriert (0,22µm))	Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes gemeinnützige GmbH, Deutschland

Tab. 2.6.: Zusätze für molekularbiologische Arbeiten

Name	Hersteller, Standort
Deoxynucleotide Mix (dNTP Mix)	New England Biolabs GmbH, Deutschland
1 kb ladder	New England Biolabs GmbH, Deutschland
0,2-2kb RNA ladder	Ambion, USA
RotiSafe	Carl-Roth GmbH & Co KG, Deutschland

2.1.6 Medien

Tab. 2.7.: Kommerziell erwerbbare Medien

Name	Zusätze durch Hersteller	Hersteller, Standort
AIM V [®]	L-Glutamin, 50µg/ml Streptomycinsulfat, 10µg/ml Gentamicinsulfate	Gibco [®] , USA
DMEM	4.5g/l Glucose, 1% L-Glutamin, Phenolrot	Gibco [®] , USA
RPMI 1640	4.5g/l Glucose, 1% L-Glutamin, Phenolrot	Gibco [®] , USA
	4.5g/l Glucose, 1% L-Glutamin, ohne Phenolrot	Gibco [®] , USA
Opti-MEM	1% L-Glutamin, ohne Phenolrot	Gibco [®] , USA

Tab. 2.8.: Spezielle Medien und deren Zusammensetzung

Name	Zusammensetzung
DZ Medium	AIM V [®] + 1% Humanserum
Kryokonservierungsmedium	FCS + 10% DMSO
Phoenix Medium	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 1% 0,2M L-Glutamin + 1% nicht essentielle Aminosäuren (NEAA) + 2,5% Hepes → steril filtrieren (0,22µm)
Fibroblasten Medium	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 2,5% Hepes
T-Zell Medium	AIM V [®] + 10% Humanserum
Standard-Zellkultur Medium	RPMI 1640 (mit Phenolrot) + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 2,5% Hepes RPMI 1640 (ohne Phenolrot) + 10% Humanserum

Tab. 2.9.: Medien für die Bakterienkultur

Name	Zusammensetzung
LB-Agar	10g Trypton Pepton 5g Hefeextrakt 10g Natriumchlorid 15g Agar-Agar ad 1l aqua dest. → autoklavieren
LB-Medium	10 g Trypton Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g Natriumchlorid → autoklavieren

2.1.7 Zytokine

Zytokine wurden nach Herstellerangaben auf eine definierte Stock-Konzentration in AIM V[®] gelöst und aliquotiert. Aliquots wurden bei -80°C gelagert. Aufgetaute Aliquots wurden bei 4°C bis zu vier Wochen gelagert und verwendet.

Tab. 2.10.: Zytokine

Name	Hersteller, Standort
Humanes Fc IL-7	Merck Millipore, USA
rhIFN- γ	eBioscience, USA
rhIL-1 β	Miltenyi Biotech GmbH, Deutschland
rhIL-2 (Proleukin TM)	Novartis AG, Schweiz
rhIL4	Miltenyi Biotech GmbH, Deutschland
rhIL-6	Miltenyi Biotech GmbH, Deutschland
rhIL-7	R&D Systems, Inc., USA
rhIL-12	R&D Systems, Inc., USA
rhIL-15	Pepto Tech, USA
GM-CSF (Leukine TM)	Bayer AG, Deutschland
PGE ₂ (Prostaglandin E ₂)	Sigma-Aldrich [®] Life Science, USA
TNF- α (Tumor Nekrose Faktor alpha)	Promo Cell GmbH, Deutschland

2.1.8 Enzyme

Tab. 2.11.: Enzyme

Name	Hersteller, Standort
CIP (10.000U/ml)	New England Biolabs GmbH, Deutschland
XbaI (20.000U/ml)	New England Biolabs GmbH, Deutschland
XhoI (20.000U/ml)	New England Biolabs GmbH, Deutschland
EcoRI (20.000U/ml)	New England Biolabs GmbH, Deutschland
BamHI (20.000U/ml)	New England Biolabs GmbH, Deutschland
SpeI (10.000U/ml)	New England Biolabs GmbH, Deutschland
Platinum [®] Pfx DNA Polymerase (2.500U/ml)	Thermo Fisher Scientific, USA
T4-DNA-Ligase (400.000U/ml)	New England Biolabs GmbH, Deutschland

2.1.9 Antikörper (Ak) und Fluoreszenzfarbstoffe

Verschiedene Zellpopulationen wurden durch die Durchflusszytometrie immunophänotypisiert. Folgende *mouse-anti-human* monoklonale Ak wurden unter sterilen Bedingungen genutzt und bei 4°C gelagert.

Tab. 2.12.: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Name	Konjugate	μ l/ 2x10 ⁵ Zellen	Klon	Bestellnummer	Hersteller, Standort
CCR7	FITC	2 μ l	FAB197F	150503	R&D Systems, Inc., USA
CD3	APC	1 μ l	UCHT1	555335	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
	PE	4 μ l	UCHT1	555333	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD4	APC	1 μ l	RPA-T4	561841	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
	FITC	1 μ l	RPA-T4	555346	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD8	APC	1 μ l	RPA-T8	561953	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD11c	APC	1 μ l	B-ly6	559877	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD25	PE-Cy7	1 μ l	M-A251	557741	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD28	FITC	4 μ l	CD28.2	555728	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD33	APC	3 μ l	WM53	551378	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
	FITC	3 μ l	P67.6	366619	Biolegend, USA

CD45	PE	3µl	WM53	303403	Biolegend, USA
	FITC	2µl	HI30	555482	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
	PE-Cy7	3µl	HI30	557748	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD45RA	PE-Cy7	5µl	HI100	304126	Biolegend, USA
	FITC	1µl	L48	335039	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD45RO	PE	4µl	UCHL1	555493	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD62L	FITC	4µl	DREG-56	555543	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD80	FITC	1µl	HB15e	560926	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD86	FITC	1µl	HB15e	560958	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD95	PE	4µl	DX2	555674	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD127	PE	5µl	eBioRDR5	12-1278-73	eBioscience, Inc., USA
CD223	PE-Cy7	1,5µl	3DS223H	25-2239-41	eBioscience, Inc., USA
(LAG-3)					
CD274 (PD-L1)	APC	3µl	MIH1	563741	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CD279 (PD-1)	FITC	1µl	MIH4	557860	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
HLA-ABC	PE	1µl	G46-2.6	555553	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
HLA-DR	PE	1µl	G46-6	555812	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
HLA-DQ	FITC	1µl	Tu169	555563	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
HLA-DP	-	4µl	B7/21	H127	Leinco Technologies, Inc., USA
TIM-3	PE-Cy7	1,5µl	F38-2E2	345013	Biolegend, USA
TZR αβ	PE	1µl	T10B9.1A-31	555548	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
TZR Vβ2	PE	2,5µl	MPB2D5	IM2213	BeckmanCoulter, USA
TZR Vβ6	PE	2,5µl	JU74.3	B07225	BeckmanCoulter, USA
TZR Vβ13.2	PE	2,5µl	H132	IM3603	BeckmanCoulter, USA
TZR Vβ13.1	PE	2,5µl	IMMU 222	IM2292	BeckmanCoulter, USA

Tab. 2.13.: Isotypkontrollen

Name	Konjugat	µl/ 2x10 ⁵ Zellen	Klon	Bestell- nummer	Hersteller, Standort
IgG1κ	PE	1µl	MOPC-21	555749	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
	APC	3µl	MOPC-21	555751	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
	FITC	4µl	MOPC-21	555748	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
	PE-Cy7	1µl	MOPC-21	400125	Biolegend, USA 400125
IgG2a	FITC	3µl	G155-178	555573	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
	PE	4µl	eBM2a	12-4724-42	eBioscience, Inc., USA
	PE-Cy7	5µl	MPC-11	400326	Biolegend, USA
IgG3	-	1µl	B10	14-4742-82	eBioscience, Inc., USA

Tab. 2.14.: Sekundär Antikörper

Name	Konjugat	µl/2x10 ⁵ Zellen	Bestell- nummer	Hersteller, Standort
Goat anti mouse IgG Fc	FITC	3µl	31547	Thermo Fisher Scientific, USA

Die folgenden monoklonalen (anti-human) Antikörper (mAk) wurden im ELISpot Assay verwendet.

Tab. 2.15.: ELISpot Antikörper

Antikörper	Konjugate	Verdünnung	Hersteller, Standort
mAk IFNγ 1-D1K	-	1:100	Mabtech AB, Schweden
mAk IFNγ 7-B6-1	Biotin	1:500	Mabtech AB, Schweden

Die HLA-Blockade Antikörper für den ELISpot wurden aus Hybridom Überständen aufgereinigt, mit PBS aliquotiert und bei 20°C gelagert. Diese wurden aus dem Bestand der Arbeitsgruppe entnommen und in sättigenden Konzentrationen eingesetzt. Blockierende Antikörper von Firmer wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Tab. 2.16.: Blockierende Antikörper

Spezifität	Klon	Herkunft
HLA-DR	HB55 ¹⁵⁵	Hybridom
HLA-DP	B7/21 ¹⁵⁶	Hybridom
HLA-DQ	SPV-L3 ¹⁵⁷	Hybridom
HLA-ABC	W6/32 ¹⁵⁸	Hybridom
CD4	RPA-T4	Biolegend, USA #300516
IgG1 κ	P3.6.2.8.1	eBioscience, USA #16-4714-85

2.1.10 Kits

Tab. 2.17.: Verwendete Kits

Name	Hersteller, Standort
Advantage® 2 Polymerase Mix	Clontec, USA
CD4 MicroBeads, human	MiltenyiBiotec GmbH, Deutschland
CD8 MicroBeads, human	MiltenyiBiotec GmbH, Deutschland
Dynabeads® Human T-Activator CD3/28	MiltenyiBiotec GmbH, Deutschland
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Deutschland
IOtest® Beta Mark TCR beta Repertoire Kit	BeckmanCoulter, USA
mMESSAGEmMACHINE® T7 Ultra Kit	Ambion, USA
ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit	New England Biolabs GmbH, Deutschland
QIAfilter® Midi Prep Kit	QIAGEN, Deutschland
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Deutschland
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN, Deutschland
QIAshredder™	QIAGEN, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN, Deutschland
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen, USA
Taq 2X Master Mix	New England Biolabs GmbH, Deutschland
Vectastain® Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Kanada

2.1.11 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden durch die Firma Eurofins Genomics, Deutschland generiert, die gelieferten lyophilisierten Oligonukleotide kurz herunterzentrifugiert, mit der entsprechenden Menge ddH₂O auf 100 pmol/μl verdünnt und bei -20°C gelagert.

Tab. 2.18.: Oligonukleotide

Name	Sequenz von 5' nach 3'	Verwendung
<u>T-Zell Rezeptor Isolation:</u>		
Oligo_d(T)	CGA TAA AAG CTC CGG GGA TAA CAG ATT TTT TTT TTT TTT TTT TVN	reverse Transkription
Capswitch Oligo	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG	reverse Transkription
for_Capswitch	ATA GGG AGG AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT	cDNA Amplifikation
rev_d(T)_Oligo	AAG CTC CGG GGA TAA CAG ATT	cDNA Amplifikation
for_TZRa/β	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CG	TZRa/β Kette spezifische cDNA Amplifikation

rev_TZR α _3'UTR	CTG TCT TAC AAT CTT GCA GAT C	TZR α Kette spezifische cDNA Amplifikation
rev_TZR β 1_3'UTR	CAC TTC CAG GGC TGC CTT C	TZR β 1 Kette spezifische cDNA Amplifikation
rev_TZR β 2_3'UTR	TGA CCT GGG ATG GTT TTG GAG CTA	TZR β 2 Kette spezifische cDNA Amplifikation
seq_rev_C α	TTT AGA GTC TCT CAG CTG GTA CAC GG	TZR α Sequenzierung
seq_rev_C β	TTC CCA TTC ACC CAC CAG CTC AG	TZR β Sequenzierung
<u>Klonierung von Rezeptoren in Vektoren:</u>		
for_1F3 α _XbaI	CGC TAG TCT AGA ACC ATG GAG ACC CTC TTG	TZR _{1F3α} über XbaI/XhoI in pGEM4Z
for_1F3 β _XbaI	CGC TAG TCT AGA ACC ATG CTG CTG CTT CTG CTG CTT CTG GGG	TZR _{1F3β} über XbaI/EcoRI in pGEM4Z
rev_1F3 β _EcoRI	ATA CCG AAT TCC TAG CCT CTG GAA TC	TZR _{1F3β} über XbaI/EcoRI in pGEM4Z
for_2C4 α _XbaI	CGC TAG TCT AGA GCC ATG AAG TTG GTG ACA	TZR _{2C4α} über XbaI/XhoI in pGEM4Z
for_2C4 β _XbaI	CGC TAG TCT AGA GCC ATG AGC ATC AGC CTC	TZR _{2C4β} über XbaI/XhoI in pGEM4Z
rev_CMV β _XhoI	CGC CCG CTC GAG TCA GAA ATC CTT TCT	TZR _{2C4β} über XbaI/XhoI in pGEM4Z
for_11C12 α _XbaI	CGC TAG TCT AGA GCC ATG ATG GCA GGC ATT	TZR _{11C12α} über XbaI/XhoI in pGEM4Z
for_11C12 β _XbaI	CGC TAG TCT AGA GCC ATG AGC CTC GGG CTC CTG TGC	TZR _{11C12β} über XbaI/XhoI in pGEM4Z
rev_CMV β _XhoI	CGC CCG CTC GAG TCA GAA ATC CTT TCT	TZR _{11C12β} über XbaI/XhoI in pGEM4Z
for_CD4_XbaI	AGC TAG TCT AGA GCC ATG AAC CGG GGA GTC	CD4 Korezeptor über XbaI/XhoI in pGEM4Z
rev_CD4_XhoI	ATA CCG CTC GAG TCA AAT GGG GCT ACA	CD4 Korezeptor über XbaI/XhoI in pGEM4Z
fw_DPB1 4/1/6:01	CGC TAG TCT AGA ACC ATG ATG GTT CTG CAG	HLA-DPB1*04:01, 01:01 und 06:01 über XbaI/XhoI in pGEM4Z
rv_DPB1 4/1/6:01	ATA CCG CTC GAG TTA TGC AGA TCC TCG TTG	HLA-DPB1*04:01, 01:01 und 06:01 über XbaI/XhoI in pGEM4Z
f_11C12 α ko_XbaI	CGC TAG TCT AGA GCC ATG ATG GCC GGC ATC	TZR _{11C12α} kodonoptimiert über XbaI/XhoI in pGEM4Z
r_11C12 α ko_XhoI	ATA CCG CTC GAG TCA GCT GGA CCA CAG	TZR _{11C12α} kodonoptimiert über XbaI/XhoI in pGEM4Z und XbaI/EcoRI in pMX_IRES_Neo
f_11C12 α ko_EcoRI	CGC TAG GAA TTC GCC ATG ATG GCC GGC ATC	TZR _{11C12α} kodonoptimiert über XbaI/EcoRI in pMX_IRES_Neo
f_11C12 β ko_XbaI	CGC TAG TCT AGA GCC ATG TCT CTG GGC CTG	TZR _{11C12β} kodonoptimiert über XbaI/XhoI in pGEM4Z
r_11C12 β ko_XhoI	ATA CCG CTC GAG TCA GAA GTC CTT CCG	TZR _{11C12β} kodonoptimiert über XbaI/XhoI in pGEM4Z und XbaI/EcoRI in pMX_IRES_Puro
f_11C12 β ko_EcoRI	CGC TAG GAA TTC GCC ATG TCT CTG GGC CTG	TZR _{11C12β} kodonoptimiert über XbaI/EcoRI in pMX_IRES_Puro
<u>Mutagenese von Rezeptoren</u>		
for_MurTZR β _1	TGA GCC ATC AAA AGC AGA GAT CGC ACA CAC CCA AAA GGC C	Minimalmurinisierung TZR _{1F3β} E18K + S22A
rev_MurTZR β _1	GGC CTT TTG GGT GTG TGC GAT CTC TGC TTT TGA TGG CTC A	Minimalmurinisierung TZR _{1F3β} E18K + S22A
for_MurTZR β _2	AGA CTG TGG CAT CAC CTC CGC ATC TTA CCA TCA AGG GGT CC	Minimalmurinisierung TZR _{1F3β} F133I + E136A + Q139H
rev_MurTZR β _2	GGA CCC CTT GAT GGT AAG ATG CGG AGG TGA TGC CAC AGT CT	Minimalmurinisierung TZR _{1F3β} F133I + E136A + Q139H

for_MurTZR α _1	CTT CCC CAG CTC AGA AGT TTC	Minimalmurinisierung TZR _{1F3α}
rev_MurTZR α _1	CTG TGA TGT CAA GCT GGT CG	P90S + S92V
for_MurTZR α _2	CGA CCA GCT TGA CAT CAC AGG	Minimalmurinisierung TZR _{1F3α}
rev_MurTZR α _2	AAA CTT CTG AGC TGG GGA AG	P90S + S92V
fo_T48C_	CTT CCC CAG CTC AGA CGT TCC	Minimalmurinisierung TZR _{1F3α}
TZR α 1F3	CTG TGA TGT CAA GC	E91D + S93P
rv_T48C_	GCT TGA CAT CAC AGG GAA CGT	Minimalmurinisierung TZR _{1F3α}
TZR α 1F3	CTG AGC TGG GGA AG	E91D + S93P
for_Cys_TZR β pp65	TAT ATC ACA GAC AAA TGC GTG	Zusätzliche Disulfidbrücke TZR _{1F3α}
rev_Cys_TZR β pp65	CTA GAC ATG AGG	T48C
fw_DP04:01 Mut1	CCT CAT GTC TAG CAC GCA TTT	Zusätzliche Disulfidbrücke TZR _{1F3α}
rv_DP04:01 Mut1	GTC TGT GAT ATA	T48C
fw_DP04:01 Mut2	GTG CAC AGT GGG GTC TGC ACG	Zusätzliche Disulfidbrücke TZR _{1F3β}
rv_DP04:01 Mut2	GAC CCG CAG CCC	T48C
fw_DP04:01 Mut3	GGG CTG CGG GTC CGT GCA GAC	Zusätzliche Disulfidbrücke TZR _{1F3β}
rv_DP04:01 Mut3	CCC ACT GTG	T48C
f_11C12 α ko Mut1	GGA GGA GTT CGT GCG CTT CGA	Mutagenese von HLA-DPB1*04:01 zu
r_11C12 α ko Mut1	CAG CGAC	HLA-DPB1*04:02
f_11C12 α ko Mut2	GTC GCT GTC GAA GCG CAC GAA	Mutagenese von HLA-DPB1*04:01 zu
r_11C12 α ko Mut2	CTC CTC C	HLA-DPB1*04:02
f_11C12 β ko Mut1	GGC GGC CTG ATG AGG AGT ACT	Mutagenese von HLA-DPB1*04:01 zu
r_11C12 β ko Mut1	GGA AC	HLA-DPB1*04:02
f_11C12 β ko Mut2	GTT CCA GTA CTC CTC ATC AGG	Mutagenese von HLA-DPB1*04:01 zu
r_11C12 β ko Mut2	CCG CC	HLA-DPB1*04:02
f_11C12 β ko Mut3	GGA GCA CAC CAG CAT GGA TAG	Mutagenese von HLA-DPB1*04:01 zu
r_11C12 β ko Mut3	TCC TGT CAC C	HLA-DPB1*04:02
v11C12 α ko_	GGT GAC AGG ACT ATC CAT GCT	Mutagenese von HLA-DPB1*04:01 zu
mTZR α C	GGT GTG CTC C	HLA-DPB1*04:02
v11C12 β ko_	C TTC CCA AGC TCC GAG GGC CGC	Minimalmurinisierung TZR _{11C12α}
mTZR β C	TGC GAC GTG	kodonoptimiert P90S+ S92G + E91D
r_chimF2A_	CAC GTC GCA GCG GCC CTC GGA	Minimalmurinisierung TZR _{11C12α}
TZR11C12	GCT TGG GAA G	kodonoptimiert P90S+ S92G + E91D
	C TTC CCA AGC TCC GAC GTC CCC	Minimalmurinisierung TZR _{11C12α}
	TGC GAC GTG AAG	kodonoptimiert S92V + S93P
	CTT CAC GTC GCA GGG GAC GTC	Minimalmurinisierung TZR _{11C12α}
	GGA GCT TGG GAA G	kodonoptimiert S92V + S93P
	C GAG CCT TCT AAG GCC GAG ATC	Minimalmurinisierung TZR _{11C12β}
	GCC CAC ACC CAG	kodonoptimiert E18K + S22A
	CTG GGT GTG GGC GAT CTC GGC	Minimalmurinisierung TZR _{11C12β}
	CTT AGA AGG CTC G	kodonoptimiert E18K + S22A
	C GAT TGC GGC ATT ACC TCC GCG	Minimalmurinisierung TZR _{11C12β}
	TCC TAT CAG C	kodonoptimiert E18K + S22A
	G CTG ATA GGA CGC GGA GGT AAT	Minimalmurinisierung TZR _{11C12β}
	GCC GCA ATC G	kodonoptimiert E18K + S22A
	C TCC GCG TCC TAT CAC CAG GGC	Minimalmurinisierung TZR _{11C12β}
	GTG C	kodonoptimiert H139Q
	G CAC GCC CTG GTG ATA GGA CGC	Minimalmurinisierung TZR _{11C12β}
	GGA G	kodonoptimiert H139Q
	GTA CAC AGC AGG TTC TGG GTT	Murinisierung TZR _{11C12α} kodonoptimiert
	CTG GAT GTT GGC CTT CAC GAA	
	CAG CCG	
	GGA GTC ACA TTT CTCA GAT CCT	Murinisierung TZR _{11C12β} kodonoptimiert
	CCA CCA CGG TCA GCC GGG TTC C	
	GAA CAG GGC CCG GAT GCC GGC	Megaprimer Generierung Konstrukt
	CAT CAT AGG CCC GGG GTT GGA	TZR _{11C12} kodonoptimiert huV β -
	CTC CAC GTC TCC GGC CAA CTT	muC β _F2A_huV α -muC α
	GAG AAG GTC AAA ATT CAA CGT	
	TTG TTT CAC GGA ATT TTT TTT CTT	
	GAC CAT GGC CAT	
rev_muC α _XhoI	ATA CCG CTC GAG TCA ACT GGA	Generierung Konstrukt TZR _{11C12}
	CCA CAG	kodonoptimiert huV β -muC β _F2A_huV α -
		muC α

Sequenzierung:

for_pGEM4Z_S	CGC CCA GCT CTA ATA CGA CTC	Sequenzierung in pGEM4Z
rev_pGEM4Z_S	GGA GCA GAT ACG AAT GGC TAC	Sequenzierung in pGEM4Z
Rev_pBu_IRES2	GAG GGA GTA CTC ACC CCA ACA	Sequenzierung in pBullet_IRES
for_pMX_S	CAC GTG AAG GCT GCC GAC	Sequenzierung in pMX_IRES
rev_pMX_S	CAA GCG GCT TCG GCC AGT A	Sequenzierung in pMX_IRES

2.1.12 Plasmide

Tab. 2.19.: Vektoren

Plasmid	insertertes Genkonstrukt	Beschreibung des Inserts
pGEM4Z-64A ¹⁵⁹	sig-huSurvivin-DCLamp	Insert, welches bei der Klonierung durch gewünschten TZR ersetzt wird
	TZR α DPB1*14:01	α -Kette des TZR 2C4
	TZR β DPB1*14:01	β -Kette des TZR 2C4
	TZR α DPB1*06:01	α -Kette des TZR 1F3
	TZR β DPB1*06:01	β -Kette des TZR 1F3
	TZR α DPB1*06:01 mm	minimalmurinisierte α -Kette des TZR 1F3
	TZR β DPB1*06:01 mm	minimalmurinisierte β -Kette des TZR 1F3
	TZR α DPB1*06:01 ds	α -Kette des TZR 1F3 mit zusätzlichem Cystein
	TZR β DPB1*06:01 ds	β -Kette des TZR 1F3 mit zusätzlichem Cystein
	TZR α DPB1*06:01 mm+ds	Minimalmurinisierte α -Kette des TZR 1F3 mit zusätzlichem Cystein
	TZR β DPB1*06:01 mm+ds	Minimalmurinisierte β -Kette des TZR 1F3 mit zusätzlichem Cystein
	CD4	CD4 Korezeptor
	HLA-DPA1*02:01	α -Kette 02:01 des HLA-Klasse II Molekül DP
	HLA-DPA1*01:03	α -Kette 01:03 des HLA-Klasse II Molekül DP
	HLA-DPB1*02:01	β -Kette 02:01 des HLA-Klasse II Molekül DP
	HLA-DPB1*04:01	β -Kette 04:01 des HLA-Klasse II Molekül DP
	HLA-DPB1*13:01	β -Kette 13:01 des HLA-Klasse II Molekül DP
	HLA-DPB1*01:01	β -Kette 01:01 des HLA-Klasse II Molekül DP
	HLA-DPB1*06:01	β -Kette 06:01 des HLA-Klasse II Molekül DP
	HLA-DPB1*04:02	β -Kette 04:02 des HLA-Klasse II Molekül DP
	TZR α DPB1*04:01	α -Kette des TZR 11C12
	TZR β DPB1*04:01	β -Kette des TZR 11C12
	TZR α DPB1*04:01 koop	Kodonoptimierte α -Kette des TZR 11C12
	TZR β DPB1*04:01 koop	kodonoptimierte β -Kette des TZR 11C12
	TZR α DPB1*04:01 koop + mm	Minimalmurinisierte, kodonoptimierte α -Kette des TZR 11C12
	TZR β DPB1*04:01 koop + mm	Minimalmurinisierte, kodonoptimierte β -Kette des TZR 11C12
	TZR α DPB1*04:01 koop + chim	Kodonoptimierte α -Kette des TZR 11C12 mit humaner variablen Domäne und muriner konstanten Domäne
	TZR β DPB1*04:01 koop + chim	Kodonoptimierte β -Kette des TZR 11C12 mit humaner variablen Domäne und muriner konstanten Domäne
pMX_IRES_Puro	-	Originalvektor
	TZR DPB1*04:01 koop + chim F2A	Kodonoptimierte β + α -Kette des TZR 11C12 mit humaner variablen Domäne und muriner konstanten Domäne verbunden durch ein F2A Fragment
	TZR _{pp65(495-503)}	Kodonoptimierte, über eine zusätzliche Disulfidbrücke verbundene (S57C/T48C) β + α -Kette des TZR _{pp65} , mit zusätzlichen Mutationen in der CDR3 Sequenz (CDR3 α : R114S; CDR3 β : S114P und N120H) verbunden durch ein F2A Fragment
pMA-T	TZR α DPB1*04:01 koop	Kodonoptimierte α -Kette des TZR 11C12
	TZR β DPB1*04:01 koop	Kodonoptimierte β -Kette des TZR 11C12
pBullet_IRES_Puro ¹³⁴	WT_TZR α _{MDM2}	α -Kette eines murinen TZR gegen MDM2
pBullet_IRES_Neo ¹³⁴	WT_TZR β _{MDM2}	β -Kette eines murinen TZR gegen MDM2

2.1.13 HLA-DP Typisierung der Spender der verwendeten AML Blasten, EBV-LCLs, Fibroblasten und PBMZs

Tab. 2.20.: HLA-DP Allele der AML Patienten

Bezeichnung	Diagnose	HLA-DP Allel	
		HLA-DPA1*	HLA-DPB1*
BB001	AML-M5	01:03	02:01/04:01
BB002	AML-M4	01:03	03:01/04:01
BB004	sAML aus MDS	01:03	02:01/04:01
BB005	sAML aus ET	01:03	03:01/04:01
BB006	AML (Rezidiv)	01:03/02:01	02:01/09:01
BB008	AML	01:03	03:01
MZ683	AML-M2	nicht bekannt	04:01/13:01
MZ747	AML-M2	01:03/02:01	01:01/06:01
MZ921	AML-M5	nicht bekannt	14:01/19:01
UKR110	AML-M5	01:03/02:01	01:01/03:01
UKR111	AML-M2	01:03	04:01
UKR120	AML-M5 Rezidiv	01:03/02:01	04:01/17:01
UKR121	AML-M2 Progress	01:03	03:01/04:01
UKR128	AML-M4	01:03	04:01
UKR151	AML-M0	01:03	02:01/04:02
UKR167	AML-M2	01:03/02:01	01:01/04:02

Tab. 2.21.: HLA-DP Allele der EBV-LCLs

EBV-LCL-Nummer	HLA-DP Allel	
	HLA-DPA1*	HLA-DPB1*
166	01:03/02:01	01:01/03:01
205	nicht bekannt	03:01/06:01
237	nicht bekannt	02:01/04:01
285	nicht bekannt	03:01/04:02
595	nicht bekannt	02:01/03:01
671	nicht bekannt	04:01/19:01
683	nicht bekannt	04:01/13:01
747	01:03/02:01	01:01/06:01
921	nicht bekannt	14:01/19:01
974	nicht bekannt	04:01/04:02

Tab. 2.22.: HLA-DP Allele der Fibroblastenspender

Fibroblasten-Spendernummer	HLA-DP Allel	
	HLA-DPA1*	HLA-DPB1*
11	nicht bekannt	03:01/13:01
13	nicht bekannt	02:01/04:01
15	nicht bekannt	02:01/03:01
17	nicht bekannt	02:01/03:01
19	nicht bekannt	03:01/04:01
22	nicht bekannt	04:01/04:02
29	nicht bekannt	04:01/03:01
53	nicht bekannt	04:01/04:02
58	nicht bekannt	02:01/04:01

Tab. 2.23.: HLA-DP Allele der PBMZ Spender

Spendernummer	HLA-DP Allel	
	HLA-DPA1*	HLA-DPB1*
86	nicht bekannt	nicht bekannt
89	nicht bekannt	02:01/03:01
94	nicht bekannt	02:01/04:01
95	nicht bekannt	02:01/03:01
99	nicht bekannt	nicht bekannt
100	nicht bekannt	nicht bekannt
105	nicht bekannt	nicht bekannt
109	nicht bekannt	nicht bekannt

110	nicht bekannt	nicht bekannt
115	nicht bekannt	nicht bekannt
116	nicht bekannt	nicht bekannt
118	01:03	04:01
123	01:03	04:01/04:02
129	01:03	02:01
140	02:01	01:01/14:01
165	01:03	02:01/03:01
166	01:03/02:01	01:01/03:01
167	01:03	04:01
199	02:01	05:01/17:01

2.1.14 Bakterienstämme

Tab. 2.24.: Bakterienstämme

Stamm	Hersteller, Standort
<i>E. coli</i> JM109	New England Biolabs GmbH, Deutschland
<i>E. coli</i> XL1-blue	Agilent Technologies, USA

2.1.15 Programme

Tab. 2.25.: Programme

Programm	Hersteller, Standort
CellQuest Pro	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
CloneManager 9	Scientific and Educational Software, USA
FlowJo v10.1	FlowJo LLC, Deutschland
GraphPad Prism 6.04	GraphPad Software Inc., USA
ImmunoSpot Bild Analyse Software	C.T.L., USA
Microsoft Office 2010 (Excel, Powerpoint, Word)	Microsoft Corporation, USA
MIXCR_2.0.2	

2.2 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Arbeiten fanden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur statt.

2.2.1 RNA Isolation

Zur Isolation der Gesamt-RNA von Zellen verschiedenen Ursprungs (T-Zellen, PBMZs) wurde das *RNeasy Mini Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Dabei werden die Zellen unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert und homogenisiert, RNasen durch das im Lysepuffer enthaltene Guanidium Isothiocyanat und β -Mercaptoethanol inaktiviert und die RNA an einer Silicat-Membran gebunden. Nach verschiedenen Waschschritten wird die RNA mit 30 μ l RNase freiem Wasser eluiert. Um die Degradation der gewonnenen RNA zu verhindern, wurden Instrumente und Flächen vor Verwendung mit RNase ZAP[®] gereinigt und RNase freie Pipettenspitzen sowie Reaktionsgefäße verwendet. Isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.2 Klonierung von T-Zell-Rezeptor-Genen

Die cDNA Synthese und Amplifikation einzelner TZR-Gensequenzen fand nach einer publizierten Methode basierend auf einem „*Capswitch*“-PCR-Verfahren von Birkholz und Kollegen statt (Abb. 2.1)¹³⁶. Bei dieser wird während der reversen Transkription an das 5'-Ende der entstehenden cDNA ein Oligonukleotid mit bestimmter Sequenz hybridisiert, um damit einen definierten Startpunkt für die nachfolgende PCR zur Amplifikation der cDNA zu schaffen¹³⁶.

Zunächst erfolgte hierfür die "Erststrang-Synthese Reaktion", bei der unter Verwendung von 64T-Oligonukleotiden (Tab. 2.18: Oligo_d(T)), welche an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden, die komplette mRNA in cDNA umgeschrieben wird. Nach Erreichen des 5'-Endes der mRNA synthetisiert eine Reverse Transkriptase zwei bis vier überhängende Cytosine an das 3'-Ende der cDNA an. An dieses Ende hybridisieren nun sogenannte "*Capswitch*" Oligonukleotide (Tab. 2.18: Capswitch Oligo), welche mit drei Guaninen beginnen und damit den Startpunkt der Synthese der Gesamt-cDNA durch die Polymerase bilden. Die so synthetisierte cDNA verfügt hierdurch über ein definiertes 3'- und 5'-Ende und kann nun mittels des T7-*capswitch*-Oligonukleotids nebst 64T-Oligonukleotiden (Tab. 2.18: for_Capswitch und rev_d(T)_Oligo) amplifiziert werden. Zur Vervielfältigung der TZR α -Kette und der TZR β -Ketten wurden 3'-Oligonukleotide (Tab. 2.18: rev_TZR α _3'UTR, rev_TZR β 1_3'UTR, rev_TZR β 2_3'UTR) verwendet, die an die konstanten Domänen der jeweiligen TZR-Ketten und ein 5'-Oligonukleotid (Tab. 2.18: for_TZR α/β), der an das 5'-Ende der zuvor angefügten Sequenz des *Capswitch*-Oligonukleotides bindet. Die nachfolgende Sequenzierung erfolgte über Oligonukleotide (Tab. 2.18: seq_rev_C α bzw. β), die in der konstanten Domäne in der Nähe der variablen Domäne des TZR startet.

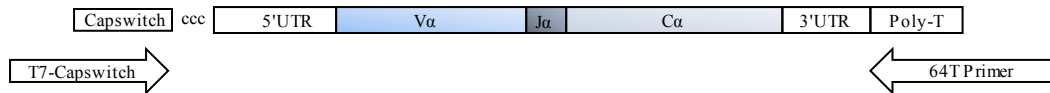
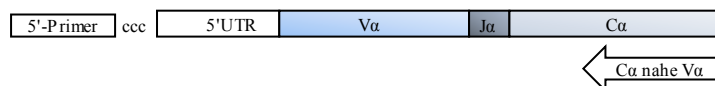
Erststrang-Synthese Reaktion**Totale cDNA PCR****TZR spezifische PCR****Sequenzierung**

Abb. 2.1.: Strategie zur Isolation und Amplifikation der Gene am Beispiel der TZR α -Kette. Zur Isolation und Amplifikation der Gene der einzelnen TZR-Ketten wird ein Verfahren nach Birkholz *et al.* verwendet¹³⁶. Hier gezeigt am Beispiel der α -Kette eines TZR. a: Adenin; c: Cytosin, g: Guanin, Ja: junktionale Domäne der TZR α -Kette, Ca: Konstante Domäne der TZR α -Kette, t: Thymin, UTR: untranslatierter Bereich, Va: variable Domäne der TZR α -Kette. Adaptiert nach Birkholz *et al.*¹³⁶.

Zur Umwandlung der in Kapitel 2.2.1.1 isolierten RNA zu cDNA wurde die *SuperScriptTM II Reverse Transkriptase* von Invitrogen verwendet. Dabei erfolgte die Synthese nach Herstellerangaben. Dafür wurden zunächst folgende Substanzen in einem Nuklease-freiem Gefäß vermischt und für 5min auf 65°C erhitzt.

1 μ l	Oligo_d(T) [10pmol/ μ l]
x μ l	RNA [1 μ g]
1 μ l	dNTPs [je 10mM]
x μ l	ddH ₂ O
Σ 12 μ l	

Nach dieser Inkubation wurde das Gemisch auf Eis abgekühlt, zentrifugiert und mit folgenden Reagenzien vermischt.

4 μ l	5x First-Strand Puffer
2 μ l	DTT [0.1M]
1 μ l	RNAseOUT TM

Daraufhin wurde die Mixtur für 2min auf 42°C erhitzt, sodann mit 1 μ l der *SuperScriptTM II* vermischt und erst bei 42°C für 50min, hiernach bei 70°C für 15min inkubiert.

Die Amplifikation der TZR-Ketten unterteilt sich in zwei Schritte. Zunächst wurde mit Hilfe der *Advantage[®] 2 Polymerase* die TZR-Genregion amplifiziert. Der Reaktionsansatz sowie das PCR Zyklus Programm setzen sich dabei wie folgt zusammen:

1µl	sscDNA	95°C	1min	} 20Zyklen
5µl	10 x Advantage Puffer	95°C	15sec	
1µl	dNTPs [je 10mM]	65°C	30sec	
2µl	rev_d(T)_Oligo [10pmol/µl]	68°C	6min	
2µl	for_Capswitch [10pmol/µl]	68°C	6min	
38µl	ddH ₂ O	4°C	∞	
<u>1µl</u>	Advantage [®] 2 Polymerase			
Σ 50µl				

Daraufhin erfolgte die spezifische Amplifikation der Sequenzen der einzelnen TZR-Ketten aus einer 1:10 Verdünnung der soeben vervielfältigten cDNA mit Hilfe der *Advantage[®] 2 Polymerase* unter Verwendung desselben Reaktionsansatzes, mit Ausnahme der Oligonukleotide. Für die α - sowie die β -Kette wurde eine PCR mit einem Vorwärts-Oligonukleotid (Tab. 2.18: for_TZR α / β), welcher an alle TZR-Ketten hybridisiert und einem reversen Oligonukleotid (Tab. 2.18: rev_TZR α _3'UTR), der spezifisch an das 3'-Ende der konstanten Domäne dieser Kette bindet, durchgeführt. Da es zwei verschiedene konstante Domänen gibt, die das 3'-Ende der β -Kette bilden können, wurden für diese Kette zwei verschiedene PCR Läufe mit unterschiedlichen reversen β -Oligonukleotiden (Tab. 2.18: rev_TZR β 1_3'UTR, rev_TZR β 2_3'UTR), aber den gleichen Vorwärts-Oligonukleotiden durchgeführt. Das PCR Zyklusprogramm setzte sich wie folgt zusammen:

Zyklusprogramm der α -Kette		Zyklusprogramm der β -Kette	
95°C	5min	95°C	5min
95°C	30sec	95°C	30sec
65°C	45sec	63°C \pm 5°C	45sec
72°C	90sec	72°C	90sec
68°C	6min	68°C	6min
4°C	∞	4°C	∞
} 30 Zyklen		} 30 Zyklen	

Das PCR Produkt wurde dann auf einem 1% Agarose-Gel hinsichtlich der Größe überprüft, mit dem *QIAquick[®] PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt und die Konzentration mittels Spektroskopie (NanoDrop) vermessen. Zur Sequenzierung wurden 5µl (100ng/µl) der Probe mit 5µl (5pmol/µl) des jeweiligen Sequenzieroligonukleotids (Tab. 2.18) vermischt und zur Firma GATC, Deutschland gesandt. Die daraus resultierenden Sequenzen wurden mit der Datenbank IMGT verglichen. Auf diesen Daten basierend erfolgte die Herstellung, der für die isolierten TZR-Subtypen spezifischen Oligonukleotide mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen, welche die TZR-Sequenz am 3'- und 5'-Ende begrenzen und die Einbringung des Genfragments in Vektoren ermöglichen. Die spezifische Isolation

wurde daraufhin mit Hilfe der *Advantage[®] 2 Polymerase* sowie dem zugehörigen Reaktionsansatz und Zyklusprogramm der β -Kette (s.o.) durchgeführt.

2.2.3 Klonierung anderer Oberflächenmoleküle (HLA-DP, CD4)

Da die Gensequenzen der verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten HLA-DPA1 und -DPB1 Moleküle sowie des CD4 Korezeptors aus der Literatur bekannt sind, konnten diese Moleküle über die für das Genfragment spezifischen Oligonukleotide in einem Schritt isoliert werden. Diese Oligonukleotide beinhalten Restriktionsschnittstellen. Zur Isolation der Gensequenz erfolgte die cDNA Synthese nach Herstellerangaben mit 1 μ g RNA mittels des *ProtoScript[®] First Strand cDNA Synthesis Kit* von NEB. Diese cDNA wurde daraufhin mit den spezifischen Oligonukleotiden wie folgt amplifiziert:

1 μ g	cDNA	95°C	1min	} 40Zyklen
25 μ l	<i>Taq</i> 2X Master Mix	94°C	30sec	
1 μ l	Vorwärts-Oligonukleotid [10pmol/ μ l]	63°C \pm 5°C	30sec	
1 μ l	Reverse-Oligonukleotid [10pmol/ μ l]	68°C	80sec	
x μ l	ddH ₂ O	68°C	5min	
Σ 50 μ l		4°C	∞	

Das Produkt wurde über ein 1% Agarose-Gel anhand der Größe analysiert, aufgereinigt und durch die Firma GATC sequenziert. PCR Produkte, die für die korrekte Sequenz kodierten, wurden anschließend für die Ligation in das entsprechende Plasmid (pGEM4Z-64A) mit einem Restriktionsverdau vorbereitet.

2.2.4 Restriktionsverdau

Die Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde als Vorbereitung der Ligation als Übernachtverdau sowie für analytische Zwecke als Testverdau durchgeführt. Dabei wurden für den Übernachtverdau 50 μ l des PCR Produktes mit 3 μ l des jeweiligen Restriktionsenzym und dem nach Herstellerangaben entsprechenden Enzympuffer in einem Endvolumen von 70 μ l mit ddH₂O vermischt. Daraufhin wurde das Gemisch für 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Effizienz des Verdau wurde mittels eines analytischen 1% Agarose-Gel analysiert und die Probe vor der Ligation mittels QIAquick[®] PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Der Testverdau erfolgt zur Kontrolle der Ligation nach Mini-DNA-Präparation einzelner, transformierter Bakterienkolonien. Für den Testverdau wurden 5 μ l der Probe aus der Mini-DNA-Präparation mit 1 μ l des jeweiligen Restriktionsenzym sowie dem nach Herstellerangaben entsprechenden Enzympuffer in einem Endvolumen von 20 μ l mit ddH₂O vermengt. Nach einer Stunde bei 37°C wurde der gesamte Testverdau auf ein 1% Agarose-Gel

aufgetragen und analysiert. Proben, die für eine Sequenzierung in Frage kamen, wurden durch das QIAquick® PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt, die Konzentration vermessen und zur Sequenzierung gesandt.

2.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gel

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen sowie präparativen, horizontalen Trennung von Nukleinsäuren. Hierbei wird sich zu Nutzen gemacht, dass die DNA eine negative Ladung trägt und deshalb in einem elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols wandert. Dabei ist die Geschwindigkeit von der Größe des zu erwartenden Genfragmentes und der Porengröße des Gels abhängig. Für ein 1% Agarose-Gel wurde Agarose mit TAE Puffer aufgekocht, während des Abkühlens mit Roti®-GelStain (0,05µl/ml) vermischt und in eine mit einem Kamm bestückte Gelkammer gegossen. Zu analysierende Proben wurden mit 6xLoading Dye versetzt und auf das ausgehärtete, in TAE Puffer liegende Gel aufgetragen. Dabei beschwert das im 6xLoading Dye enthaltene Glycerin die Probe, sodass diese zum Boden der für sie vorgesehenen Gelaussparung sinkt. Ein 2-log Größenstandard wurde als Referenz verwendet. Bei einer Spannung von 120V trennten sich die Genfragmente im Gel innerhalb von 45min der Größe nach auf. Dabei bindet der Roti®-GelStain in der kleinen Grube der DNA-Helix. Mittels Anregung dieses Fluoreszenzfarbstoffes durch UV-Licht konnten die Genfragmente im Gel durch das Typhoon Analyse Gerät sichtbar gemacht werden.

2.2.6 Ligation

Die im Restriktionsverdau geschnittenen Genfragmente wurden mit den verschiedenen Plasmiden, welche zuvor durch *calf intestinal phosphatase* (CIP) dephosphoryliert und mit den gleichen Enzymen verdaut und somit linearisiert wurden, ligiert. Hierfür wurde 1µl des Vektors mit 15µl des Genfragments sowie 2µl des angewärmten T₄ Ligase Puffers versetzt, das Gemisch mit ddH₂O auf 19µl aufgefüllt und mit 1µl der T₄ Ligase vermischt. Nach 16 Stunden bei 16°C erfolgte die Transformation der Plasmid-Geninsert DNA.

2.2.7 Mutagenese

Die Mutagenese von TZR-Ketten wurde unter Verwendung des *QuickChange® Site-Directed Mutagenese Kit* durchgeführt. Dieses erlaubt einen Austausch von Basen in einem definierten Bereich der doppelsträngigen DNA. Hierzu wurden zunächst komplementäre Oligonukleotidpaare, welche für die gewünschte Mutation kodieren, durch kommerzielle Anbieter (Eurofins) synthetisiert. Unter Verwendung dieser mutationskodierenden

Oligonukleotide in einer PCR Reaktion konnte die gewünschte Mutation im Ausgangsgen eingefügt werden. Der Reaktionsansatz wurde hierbei mit dem Zusatz der 10x*QuickSolution* nach Herstellerangaben angesetzt und das im Handbuch angegebene PCR-Programm verwendet. Beim nachfolgenden einstündigen *DpnI* Verdau wurde die ursprüngliche nicht mutierte Plasmid-DNA verdaut. Diese ist im Gegensatz zur mutierten DNA auf Grund ihrer Herkunft aus *E. coli* methyliert. Nach der Mutagenese wurde die Plasmid DNA in kompetenten XL-1 Blue Bakterien transformiert und die DNA per Mini-Präparation isoliert. Abschließend fand eine Kontrolle des Erfolgs der Mutagenese durch eine spezifische Sequenzierung der DNA-Sequenz statt.

2.2.8 Murinisierung der TZR-Sequenz

Der Austausch der kompletten humanen, konstanten Domäne durch die murine, konstante Domäne beider Ketten des HLA-DPB1-spezifischen TZR_{DPB1*04:01} erfolgte über eine PCR Reaktion unter Verwendung der PlatinumTM *Pfx* DNA Polymerase von Invitrogen. Hierbei wurde die variable Domäne des humane TZR_{DPB1*04:01} über einen „chimären“ Primer mit der konstanten Domäne des murinen TZR_{MDM2} aus dem Bestand der Arbeitsgruppe fusioniert. PCR Ansatz und Zyklusprogramm der TZR β -Kette sind im Folgenden dargestellt:

1 μ l	pGEM4Z-64A_TZR β DPB1*04:01 koop [100ng/ μ l]	
1 μ l	pBullet_IRES_Neo_WT_TZR β MDM2 [100ng/ μ l]	
0,5 μ l	Vorwärts-Oligonukleotid (for_pGEM4Z_S) [10pmol/ μ l]	94°C 2min
0,5 μ l	Reverse-Oligonukleotid (rev_pBu_IRES2) [10pmol/ μ l]	94°C 30sec
0,5 μ l	Verbindungs-Oligonukleotid (v11C12 β ko_mTZR β C) [10pmol/ μ l]	55°C 45sec
		68°C 60sec
		94°C 30sec
2 μ l	dNTPs [je 10mM]	55°C 45sec
5 μ l	10xPfx Amplifikationspuffer	68°C 7min
5 μ l	10xPCR <i>Enhancer</i> Lösung	4°C ∞
1 μ l	MgSO ₄ [50mM]	
0,5 μ l	Platinum TM <i>Pfx</i> DNA Polymerase [2,5U/ μ l]	
33 μ l	ddH ₂ O	
Σ 50 μ l		

Selbige Reaktion wurde auch für die α -Kette des TZR_{DPB1*04:01} durchgeführt (DNA-Templates: pGEM4Z-64A_TZR α DPB1*04:01koop, pBullet_IRES_Puro_WT_TZR α MDM2, Verbindungs-Oligonukleotid: v11C12 β ao_mTZR α C). Die Produkte wurden daraufhin mittels des *QIAquick[®] PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt, mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und in einer weiteren, darauffolgenden PCR mit den Sequenzen, der für die Klonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen versehen. Hier am Beispiel der β -Kette gezeigt

(α -Kette analog zur β -Kette mit Ausnahme der Primer: f_11C12 α ko_XbaI, r_11C12 α ko_XhoI):

1 μ l	Produkt der PCR I		
0,5 μ l	Vorwärts-Oligonukleotid (f_11C12 β ko_XbaI) [100pmol/ μ l]		
0,5 μ l	Reverse-Oligonukleotid (r_11C12 β ko_XhoI) [100pmol/ μ l]	94°C	2min
0,5 μ l	dNTPs [je 10mM]	94°C	30sec
5 μ l	10xPfx Amplifikationspuffer	55°C	45sec
5 μ l	10xPCR <i>Enhancer</i> Lösung	68°C	60sec
1 μ l	MgSO ₄ [50mM]	94°C	30sec
0,5 μ l	Platinum TM Pfx DNA Polymerase	55°C	45sec
	[2,5U/ μ l]	68°C	7min
		4°C	∞
36 μ l	ddH ₂ O		
Σ 50 μ l			

} 34 Zyklen

So generierte chimäre TZR wurden mit den passenden Restriktionsenzymen über Nacht verdaut und in Vektor pGEM4Z-64A kloniert.

2.2.9 Generierung eines TZR β -F2A-TZR α Fusionsgens

Um eine hohe, äquimolare Expression von TZR α - und β - Kette nach retroviraler Transduktion zu generieren, wurde die DNA-Sequenz der β -Kette über ein F2A Fragment mit der Sequenz der α -Kette des TZR-Gens fusioniert. Die 22 Aminosäuren lange 2A Region des *foot-and-mouth disease virus* (Furin-2A, F2A) kodiert für ein sich selbst spaltendes 2A Peptidelement. Durch dieses Element kann die Trennung beider Ketten zwischen dem C-terminalem Glycin der 2A Aminosäuresequenz und dem N-terminalem Prolin des folgenden Polypeptids mittels ribosomalen *skipping* erfolgen und so ein äquivalentes Level der endogenen TZR α - und β -Ketten Translation gewährleistet werden^{160,161}. Die Generierung eines solchen Konstruktes wurde nur für den HLA-DPB1-spezifischen TZR_{DPB1*04:01} durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die Sequenz des F2A Peptids über einen Primer an das 3'-Ende der TZR β -Ketten Sequenz in einer ersten PCR Reaktion fusioniert:

1µl	TZR β-Kette (TZRβ _{DPB1*04:01} koop + chim) [100ng/µl]	
1µl	Vorwärts-Oligonukleotid (f_11C12βko_EcoRI) [10pmol/µl]	94°C 3min
10µl	Reverse-Oligonukleotid (r_chimF2A_TZR11C12) [10pmol/µl]	94°C 15sec
0,5µl	dNTPs [je 10mM]	65°C 30sec
5µl	10xPfx Amplifikationspuffer	68°C 2min
5µl	10xPCR <i>Enhancer</i> Lösung	68°C 5min
1µl	MgSO ₄ [50mM]	4°C ∞
0,4µl	Platinum TM Pfx DNA Polymerase [2,5U/µl]	
<u>27,1µl</u>	ddH ₂ O	
Σ 50µl		

} 25 Zyklen

Das Produkt dieser PCR wurde daraufhin mittels des *QIAquick® PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt und in einer darauffolgenden PCR eingesetzt. In dieser zweiten PCR Reaktion wurde die α-Kette des TZR_{DPB1*04:01} mit dem, in der ersten PCR Reaktion entstandenen TZRβ_{DPB1*04:01}-F2A Konstrukt fusioniert.

1µl	TZR α-Kette (TZRα _{DPB1*04:01} koop + chim) [100ng/µl]	
25µl	TZRβ _{DPB1*04:01} -F2A Konstrukt aus PCR I	
1µl	Reverse Oligonukleotide (rev_muCα_XhoI) [10pmol/µl]	94°C 3min
0,5µl	dNTPs [je 10mM]	94°C 15sec
5µl	10xPfx Amplifikationspuffer	55°C ± 10°C 30sec
5µl	10xPCR <i>Enhancer</i> Lösung	68°C 2min
1µl	MgSO ₄ [50mM]	68°C 5min
0,4µl	Platinum TM Pfx DNA Polymerase [2,5U/µl]	4°C ∞
<u>11,1µl</u>	ddH ₂ O	
Σ 50µl		

} 25 Zyklen

Nach dieser PCR wurde das PCR Produkt durch ein Agarose-Gel analysiert, aufgereinigt und über Restriktionsschnittstellen in einen retroviralen Vektor kloniert.

2.2.10 Transformation

Um DNA in Bakterien einzubringen, wurden chemisch kompetente *E. coli* (JM109 oder XL1-Blue) mittels des Hitzeschockverfahrens transformiert. Hierzu wurden pro Ansatz 100µl kompetente Bakterien auf Eis angetaut und 10µl Ligations- oder Mutageneseansatz bzw. 1µg DNA (aus Mini-/Midi-/Maxi-Präparationen) zugegeben. Nach weiteren 30 Minuten auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C. Dabei bilden sich in der Zellmembran der Bakterien Poren, wodurch die DNA eindringen kann. Danach wurden die Zellen für eine

Minute erneut auf Eis inkubiert, anschließend mit 1ml LB-Medium vermischt und für 40 Minuten (JM109) bis 60 Minuten (XL1-Blue) bei 37°C und 280Upm geschüttelt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 800µl der Bakterien des Ligations- oder Mutageneseansatzes sowie 50µl der Bakterien der Mini-/Midi-/Maxi-Präparationsansätze auf einer LB_{Amp} (0,1mg/ml) Agarose Platte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.11 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte je nach benötigter DNA Menge durch das Mini-, Midi- oder Maxipräp-Kit der Firma Qiagen, wobei die Verfahren nach Herstellerangaben durchgeführt wurden. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse¹⁶², bei der das in dem Puffer 2 enthaltene SDS Phospholipide und Proteine aus den Zellwänden löst und die alkalische Bedingung die Denaturierung von Proteinen, chromosomaler DNA sowie Plasmid-DNA begünstigt. Durch den Puffer 3 wird das Lysat neutralisiert. Dabei verursachen hohe Salzkonzentrationen die Präzipitation der denaturierten Proteine, der chromosomalen DNA sowie der Zelltrümmer mit SDS. Die Plasmid-DNA renaturiert und liegt in Lösung vor. Diese wurde anschließend auf eine Säule mit einer Silica-Gel-Membran aufgetragen, in verschiedenen Waschschritten gereinigt und durch ddH₂O von der Säule eluiert. Bei der DNA-Präparation mit dem Maxi-Kit sorgte ein zusätzlicher Inkubationsschritt für die Entfernung aller Endotoxine aus dem Präparat, was für die Verwendung der Plasmid-DNA in einer retroviralen Transduktion von Vorteil ist. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde im Falle der DNA der Maxi-Präparation auf 1µg/µl verdünnt. Alle Plasmid-DNA wurden bei -20°C gelagert.

2.2.12 Linearisierung von Plasmid-DNA zur Durchführung einer *in vitro* Transkription (IVT)

Um eine zu lange fortlaufende Progression der RNA-Polymerase während der Herstellung *in vitro* transkribierter RNA an einem zirkulären Plasmid zu verhindern, wurde die Vektor-DNA zunächst mittels des Restriktionsenzym *SpeI* linearisiert. Hierfür wurden 20/40µg Vektor DNA mit 3/6µl *SpeI* sowie der einfachen Konzentration des *10xCutSmart* Puffers versetzt und mit ddH₂O auf ein Volumen von 30/60µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde dann für 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.13 Phenol-Chlorform-Aufreinigung der Ansätze zur Durchführung einer IVT

Um die in den Puffern enthaltenen Salze und Proteine aus dem Restriktionsansatz zu entfernen, wurde die DNA gereinigt. Hierfür wurde der Ansatz mit ddH₂O auf 400µl aufgefüllt und mit der gleichen Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Nach einer Durchmischung der Probe erfolgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 13.000U_{pm}, wobei zwei Phasen entstehen. In der unteren organischen Phase sammeln sich denaturierte Proteine, während die obere wässrige Phase die Nukleinsäure enthält. Die wässrige Phase wurde in ein frisches mit 400µl vorgelegtem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gefülltes Gefäß überführt. Nach viermaliger Wiederholung wurde der Überstand nur mit Chloroform versetzt und analog zu den ersten Schritten fünf Mal gewaschen. Zur Präzipitation der DNA wurde dem Überstand (ca. 400µl) 40µl Natriumacetat und 1000µl EtOH zugegeben und dieser für zwei Stunden bei 20°C inkubiert. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 13.000U_{pm} und 4°C wurde der Überstand verworfen und mit 1400µl 70%-igem EtOH gewaschen. Nach Wiederholung des Zentrifugationsschrittes wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet, in RNase freiem Wasser (20/40µl je nach eingesetztem Vektor-DNA Volumen) gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.14 Generierung und Aufreinigung von *in vitro* transkribierter (IVT) RNA

Die *in vitro* Synthese großer Mengen RNA erfolgte über das *mMessage mMachine*[®] T7 *Ultra Kit*. Grundlegend für den Erfolg dieser Methode ist die Verwendung eines Plasmids, das einen T7 RNA-Polymerase Promotor in der DNA-Region vor der zu transkribierenden Sequenz besitzt. Zu diesen zählt der hier verwendete pGEM4Z-64A, der außerdem noch für einen 3'-Poly-A-Schwanz kodiert. Die Synthese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei Inkubationszeiten wie folgt verändert wurden. So wurde im ersten Schritt die Dauer des Anfügens des ARCA (engl. *anti reverse cap analog*) an das 5'-Ende der mRNA von einer auf drei Stunden erweitert. ARCA ist ein modifiziertes Cap-Analogon, welches statt einer vierten 3'-OH-Gruppe eine OCH₃ besitzt. Diese Substitution ermöglicht der T7 RNA Polymerase die Transkription nur an den übrigen -OH Gruppen zu initialisieren, wodurch das Cap Analogon nur in der richtigen Orientierung angefügt werden kann. So erhält man eine Ausbeute von 100% funktionaler RNA mit Cap-Struktur, welche für die Stabilität und Verarbeitung der mRNA *in vivo* essentiell ist. Die nachfolgende DNase Inkubation und anschließende 3'-Poly-Adenylierungsreaktion, zur Erhöhung der Stabilität der mRNA und dem Schutz vor

Abbauprozessen, wurde auf eine Stunde verlängert. Je nach benötigter Menge wurde das Protokoll in 1-facher oder in 2,5-facher Ausführung verwendet. Nach der RNA-Synthese wurde das Reaktionsgemisch sofort mit 700µl RLT-Puffer und 500µl Ethanol versetzt und zügig nach Protokoll des RNeasy Mini Kits über ein Säulen-System aufgereinigt. Daraufhin erfolgte die Elution der RNA mit Nuklease-freiem Wasser (50-70µl) sowie die Konzentrationsbestimmung der Probe. Je 10µg RNA wurden in einem RNase-freien Reaktionsgefäß bei -80°C gelagert. Eine Überprüfung der Reinheit der Probe fand mittels eines analytischen, denaturierenden Agarose-Gels (1%) statt.

2.2.15 Identifizierung des TZR Vβ-Repertoires

T-Zell-Populationen, deren Vβ-Ketten auf Grund des Fehlens kommerziell erwerblicher Ak nicht durchflusszytometrisch identifiziert werden konnten (siehe Kapitel 2.4.2), wurden mit Hilfe einer in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Rehli (Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Regensburg) etablierten, bislang nicht publizierten Methode analysiert. Bei dieser auf einer RACE PCR basierenden Methode wurde die RNA mittels eines *Random Primer Mix* und *Smarter* Oligonukleotiden in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit Hilfe der *Advantage[®] 2 Polymerase*. Dabei bindet ein reverses Oligonukleotid in der variablen Region der TZR Vβ-Ketten und ein vorwärts Oligonukleotid, das an die zuvor eingebrachten *Smarter* Sequenzen bindet, in der variablen Region des TZR. Daraufhin wurden durch eine weitere PCR Probenbarcodes eingebracht, welche für das *Next generation sequencing* notwendig sind. Die so entstandenen TZR-libraries wurden nachfolgend durch den *MiSeq (Illumina Sequencer)* sequenziert und die daraus resultierenden Daten mittels der MIXCR_2.0.2 Software analysiert.

2.3 Zellbiologische Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen gehalten und bei 37°C in einem Inkubator mit 95% Luftfeuchtigkeit sowie einer Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert. Die Zählung von Zellen erfolgte nach lebend/tot-Färbung mit Trypanblau mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

2.3.1 Isolation von PBMZ und AML Blasten über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolation von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation aus den Blutbestandteilen von sog. Leukozyten-reduktionskammern der Thrombozytenspende gesunder Spender (Transfusionsmedizin des

Universitätsklinikums Regensburg) oder aus peripherem Blut von AML Patienten. Patienten und Spender wurden hierfür nach den Standards der Deklaration von Helsinki und nach der Genehmigung durch die zuständige Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung für die Verwendung der Proben zu Forschungszwecken. Bei der Gradientenzentrifugation werden mononukleare Zellen auf Grund unterschiedlicher Dichten von anderen Zellen, wie z.B. Erythrozyten getrennt. Dafür wurde das Blut 1:2 mit PBS (RT) verdünnt und je 30ml vorsichtig auf 15ml des Lymphozyten-Separationsmediums Ficoll (RT) gegeben. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 2.200Upm ohne Bremse konnten die PBMZ, die sich in der Interphase über dem Separationsmedium gesammelt hatten, entnommen werden. Die so isolierten Zellen wurden drei Mal mit PBS gewaschen, in dem Einfriermedium mit bis zu 100×10^6 Zellen bei zunächst -80°C eingefroren und für die dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt.

2.3.2 Zelllinien

Für funktionelle Analysen oder zur Stimulation von T-Zellen fanden sowohl adhärenente, als auch nicht-adhärenente Zelllinien Verwendung. Nicht adhärenente Zelllinien wie die TZR defiziente Jurkat76 T-Zell-Linie¹⁶³, die TAP-defiziente Zelllinie T2¹⁶⁴ sowie Epstein Barr-Virus transformierte B-lymphoblastoide Zelllinien (EBV-LCL) wurden in Standard-Kulturmedium (siehe Tab. 2.8) in $25\text{-}75\text{cm}^2$ Zell-Kultur-Flaschen kultiviert und zweimal pro Woche mit einer Zellkonzentration von $0,4 \times 10^6$ Zellen/ml neu ausgesät. Zur Kultivierung der adhärenenten Keratinozytenzelllinie HaCaT wurden konfluent wachsende Zellen mit 37°C warmen PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA (1-3ml) bei 37°C abgelöst. Der Trypsinierungsvorgang wurde nach ca. 5 Minuten mit dem Standard-Kulturmedium gestoppt. Daraufhin wurden die Zellen bei 1.500Upm für fünf Minuten zentrifugiert, gezählt und $0,2 \times 10^6$ HaCaT in einer 75cm^2 Flasche ausgesät.

2.3.2.1 Generierung und Kultivierung von B-lymphoblastoiden Zelllinien

EBV-LCLs wurden nach einem Standard Protokoll von Tatsumi und Kollegen generiert¹⁶⁵. Hierfür wurden 10×10^6 PBMZ für fünf Stunden bei 37°C , 5% CO_2 mit 0,5ml eines EBV-haltigen Zellkulturüberstands der Zelllinie B95.8 inkubiert, anschließend mit 4,5ml Standard-Kulturmedium vermischt und in einer hochkant stehenden 25cm^2 Zell-Kultur-Flasche ausgesät. Um das Wachstum von T-Zellen zu inhibieren, erfolgte die Zugabe von $1\mu\text{g/ml}$ Cyclosporin A. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gewaschen und erneut in 5ml

Standard-Kulturmedium ausgesät. Proliferierende Zellen wurden expandiert und eingefroren oder kultiviert und in funktionellen Analysen verwendet.

2.3.3 Generierung von reifen dendritischen Zellen

Die Generierung ausgereifter dendritischer Zellen (mDZs; engl.: *mature*) erfolgte nach dem sog. *Fast-DC* Protokoll von Dauer und Kollegen¹⁶⁶. Hierfür wurden 20×10^6 PBMZ in 3ml DZ-Medium in einer Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 1½ Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurden nicht-adhärenente Zellen mit 37°C warmen PBS vorsichtig gewaschen und den am Kunststoff adhätierenden Monozyten 3ml neues DZ-Medium mit 1000IU/ml GM-CSF sowie 500IU/ml IL4 zugegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium zusätzlich mit 10ng/ml IL-1 β , 10ng/ml TNF- α , 1000IU/ml IL-6 und 1 μ g/ml PGE₂ vermischt¹⁶⁷. Weitere 24 Stunden später erfolgte mit Hilfe von 4°C kaltem PBS die Ernte der mDZs, welche für die Transfektion mit HLA-DP Molekülen verwendet wurden. Nicht transfizierte mDZs wurden in Einheiten von 0,2 bis $0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml Kryokonservierungsmedium weggefroren. Bis zur Verwendung in funktionellen Tests fand eine Verwahrung der Zellen in -196°C flüssigem Stickstoff statt.

2.3.4 Kultivierung und Vorbehandlung von AML Blasten

Die verwendeten Leukämiezellen stammten aus der Blastenbank des Universitätsklinikums Regensburg. Eingefrorene Blasten von AML Patienten, isoliert aus dem peripheren Blut über Ficoll-Dichtezentrifugation (Kapitel 2.3.1), wurden als Zielzellen für funktionelle Analysen und zur phänotypischen Charakterisierung aufgetaut. Die Kultivierung erfolgte für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ mit 2×10^6 Blasten/ml in einer Vertiefung einer 6-Lochplatte in AIM-V[®]+10% HS. Um in AML-Blasten eine HLA-Expression zu induzieren, wurde dem Medium für 24 Stunden 500IU/ml IFN- γ zugesetzt.

2.3.5 Kultivierung und Vorbehandlung von Fibroblasten

Humane Fibroblasten, die initial aus der juvenilen Penisvorhaut von Kindern isoliert wurden, wurden aus dem Zellbestand der Arbeitsgruppe verwendet. Eingefrorene Fibroblasten wurden aufgetaut und 5×10^6 Zellen in einer 175cm² Zell-Kultur-Flasche mit 20ml Fibroblastenmedium ausgesät. Je nach Proliferationspotential erfolgte die Kultivierung der adhärenenten Zellen für 3-7 Tage nach dem Auftauen. Zur Kultivierung wurden konfluent wachsende Zellen mit warmen PBS (37°C) gewaschen und mit 3ml Trypsin-EDTA bei 37°C abgelöst. Der Trypsinierungsvorgang wurde nach ca. fünf Minuten mit Standard-Kulturmedium gestoppt.

Daraufhin wurden die Zellen bei 1.500Upm für fünf Minuten zentrifugiert, gezählt und je $1,5 \times 10^6$ Fibroblasten in einer 175cm^2 Zell-Kultur-Flasche ausgesät. Für funktionelle Analysen erfolgte die Aussaat von 2×10^5 Fibroblasten in einer 75cm^2 Zell-Kultur-Flasche mit 8ml Fibroblasten-Medium. Zur Induktion einer inflammatorischen Bedingung wurde das Medium mit 500IU/ml IFN- γ vermischt und die Zellen darin für 96 Stunden vor Verwendung inkubiert.

2.4 Immunbiologische Methoden

2.4.1 Magnetische Zellseparation

Bei der magnetischen Zellseparation (MACS; *magnetic activated cell sorting*) werden Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle mittels Magnetpartikel-gekoppelter monoklonaler Ak (Beads) markiert und mit Hilfe einer Säule in einem starken Magnetfeld von nicht markierten Zellen getrennt¹⁶⁸. Für die positive Selektion von CD4^+ oder CD8^+ T-Zellen wurden PBMZ aufgetaut, durch Waschen mit PBS von Rückständen des Einfriermediums befreit und gezählt. Daraufhin wurden je 1×10^7 T-Zellen (10% bzw. 20% der PBMZ sind CD8^+ bzw. CD4^+ T-Zellen) in 80 μl kaltem MACS Puffer (4°C) aufgenommen, mit 20 μl spezifischen Mikrobeads vermischt und für 20min bei 4°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Suspension in 10ml kaltem MACS Puffer gewaschen. 1×10^8 PBMZ wurden mit je 500 μl kaltem MACS Puffer gemischt und auf eine vorequilibrierte, in den MACS MultiStand eingebrachte LS Säule, mit zusätzlichem Vorseparationsfilter überführt. Diese Säule beinhaltet magnetisierte Stahlwolle, wodurch die durch Mikrobeads magnetisch markierten T-Zellen innerhalb der Säule binden und nicht markierte Zellen weiter aus der Säule hinaus fließen. Nach dreimaligem Waschen mit 3ml kaltem MACS Puffer erfolgte durch mechanischen Druck die Elution der Zellen in 10ml Puffer. Gelöste Zellen wurden gewaschen, gezählt und ausgesät.

2.4.2 Kultivierung von durch magnetische Zellseparation isolierten T-Zellen

Zur Kultivierung wurden die durch die magnetische Zellseparation isolierten T-Zellen in einer 24-Lochplatte mit AIM-V[®]+10% HS ausgesät. Dabei wurden für die Transfektion mit TZR kodierender RNA 2×10^6 T-Zellen in 2ml auf eine Lochplattenvertiefung verteilt und mit T-Zell-aktivierenden CD3/28 Dynabeads ($0,2 \times 10^6$ Beads pro 1×10^6 T-Zellen) sowie 100U/ml IL-2, 5ng/ml IL-7 und IL-15 versetzt. Zellen wurden bei konfluentem Wachstum zwischen $1,5\text{-}2 \times 10^6$ T-Zellen pro ml in einem Verhältnis von 1:2, unter Zugabe von je 1ml frischem AIM-V[®]+10% HS mit 25-100U/ml IL-2 passagiert. Eine Elektroporation der Zellen konnte ab Tag 7 der Beadstimulation durchgeführt werden. Für die retrovirale Transduktion wurden 4×10^6 T-Zellen

in 2ml in einer Lochplattenvertiefung einer 24-Lochplatte ausgesät. Je nach angewandtem Stimulationsprotokoll wurden die Zellen mit $0,6 \times 10^6$ CD3/28 *Dynabeads* pro 1×10^6 T-Zellen oder mit 50ng pro 2×10^6 T-Zellen anti-human CD3 Ak (OKT3) versetzt. Zusätzlich erhielten diese Zellen 100U/ml IL-2 und wurden bis zur retroviralen Transduktion 48 Stunden später nicht gesplittet.

2.4.3 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (FACS, fluoreszenzaktivierte Zellanalyse) handelt es sich um eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen in einem Flüssigkeitsstrom. Hierfür werden Zellen zunächst mittels Fluoreszenzfarbstoff direkt oder indirekt gekoppelten Ak markiert. Im Zytometer werden Zellen mittels hydrodynamischer Fokussierung aufgetrennt und einzeln an verschiedenen, gebündelten Laserstrahlen mit geeigneter Wellenlänge vorbeigeführt. Das Signal, welches der Detektor durch die Anregung Fluorochrom-markierter Zellen erhält, gibt Aufschluss über die Menge an gebundenem Ak pro Zelle. Zusätzlich liefern Lichtstreuung und Beugung Informationen über Zellgröße sowie Granularität des Zytoplasmas.

Fluoreszenzfärbung zur quantitativen Analyse: Zur durchflusszytometrischen Analyse des Immunphänotyps von Zellpopulationen wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen in ein FACS Röhrchen überführt und mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde das Zellpellet mit einer zuvor bestimmten Menge an konjugierten oder unkonjugierten Ak vermischt. Nach 20 Minuten Inkubation bei 37°C im Dunkeln erfolgte die Entfernung nicht gebundener Ak durch erneutes Waschen. Falls die erste Markierung mit einem unkonjugiertem Ak erfolgte, wurde dieser Vorgang mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Ak wiederholt. Zur Analyse wurden gefärbte Zellen in 200µl FACS Fixans Puffer resuspendiert.

Fluoreszenzfärbung zur Sortierung einzelner T-Zell-Populationen: Die phänotypische Isolation naiver $\text{CD3}^+/\text{CD45RA}^+$ T-Zellen erfolgte an einem FACS Aria™ Zellsorter. Hierfür wurden MACS isolierte CD4^+ T-Zellen in einem sterilen FACS-Röhrchen pelletiert, in 255µl Sort-Puffer aufgenommen und mit je 55µl der Ak anti-CD3 und anti-CD45RA vermischt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit 1,5ml Sort-Puffer gewaschen. Zur Vermeidung von Zell-Agglomeraten wurden die Zellen durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 30µm gefiltert und in Sort-Puffer auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Naïve T-Zellen fanden in verschiedenen Stimulationen Verwendung.

Fluoreszenzfärbung zur Bestimmung des V β -Ketten Repertoires eines T-Zell-Klons: Die Identifikation der V β -Kette eines T-Zell-Klons erfolgte mittels des *IOTest[®] Beta Mark TCR beta Repertoire Kit* nach Herstellerangaben.

Nach der Durchführung der Durchflusszytometrie wurden die so gewonnenen Daten mit Hilfe des Programms FlowJo analysiert. Dabei ergaben sich aus der Analyse mehrere Werte. Hierzu zählt zum einen der prozentuale Anteil einer T-Zell-Population in einem Quadranten, zum anderen die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) einer Färbung, die das Mittel der Gesamtzahl zwischen positiven und negativen Partikel beschreibt. Die relative mediane Fluoreszenzintensität (rMFI) wurde durch die Division des MFI der Antigenfärbung durch den MFI der zum Marker gehörigen Isotypkontrolle errechnet und nur durchgeführt, sofern eine Isotypkontrolle in der Analyse mitgeführt wurde.

2.4.4 Transfektion von Zellen mit RNA durch Elektroporation

Um eine transiente Expression verschiedener Oberflächenmoleküle zu erreichen, wurden Zellen mit IVT RNA elektroporiert. Hierbei wird die Zelle durch ein elektrisches Feld kurzzeitig permeabilisiert, wodurch die RNA in die Zelle eindringen kann. Zu transfizierende Zellen wurden in Standardmedium aufgenommen und gezählt. Pro Elektroporationsansatz wurden 5×10^6 Zellen (bei Zelllinien) oder bis zu 1×10^7 Zellen (bei T-Zellen und mDZs) je einmal für 10min bei 1.000Upm in RPMI ohne Phenolrot sowie Opti-MEM gewaschen und anschließend in 200 μ l Opti-MEM resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in eine Elektroporationsküvette (4mm) überführt, in der eine oder mehrere RNAs (10 μ g pro RNA) vorgelegt wurden. Diese wurde dann mit 500V (T-Zellen) bzw. 400V (Zelllinien) für 5ms mit einem Rechteckimpuls elektroporiert. Anschließend wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen in 1ml ihres Kulturmediums, im Falle der T-Zellen mit 50U/ml IL-2, in einer Vertiefung einer 12-Lochplatte ausgesät.

2.4.5 Stabile TZR-Integration durch retrovirale Transduktion

Das Prinzip der stabilen Integration der TZR-Gensequenzen in T-Zellen beruht auf der transienten Transfektion einer Verpackungszelllinie, welche daraufhin retrovirale TZR kodierende Viruspartikel produziert. Diese Partikel können zur stabilen Transduktion von Lymphozyten verwendet werden.

2.4.5.1 Herstellung von Retrovirus-haltigen Kulturüberständen

Zur Herstellung amphotroper, retroviraler Partikel wurde die Retrovirus-Verpackungszelllinie Phoenix-Ampho verwendet¹⁶⁹. Diese beruht auf der embryonalen Nieren-Zelllinie HEK293T, welche stabil mit den, auf dem Moloney murinen Leukämievirus basierenden Hilfskonstrukten für die Produktion der gag-Proteine (retrovirale, gruppen-spezifische Antigene), pol-Proteine (reverse Transkriptase, RNaseH und Integrase) sowie der env-Proteine (amphotropes Virus-Hüllprotein) transfiziert wurde^{170,171}. Für die retrovirale Transduktion von T-Zellen musste der Verpackungszelllinie zunächst die genetische Information des TZR durch Transfektion übertragen werden. Diese kann dann durch die Genprodukte der vorhandenen Hilfskonstrukte zu einem infektiösen Retrovirus verpackt werden. Dabei wurde die Methode von Voss und Kollegen mit leichten Änderungen angewandt¹²⁸. Hierfür wurden die adhärenz wachsenden Zellen in 75cm² Zell-Kultur-Flaschen in DMEM mit speziellen Zusätzen (siehe Kapitel 2.1.6: Phoenixmedium) bei 37°C sowie 5% CO₂ kultiviert und bei 70%iger Konfluenz passagiert. Dabei fand die Zentrifugation der Zellen bei maximal 13.000Upm statt. Am Tag vor der Transfektion wurden 2x10⁶ Zellen/75cm² Zell-Kultur-Flasche in 15ml Phoenixmedium ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte vier Stunden vor der Transfektion ein Mediumwechsel mit 10ml frischem Medium. Zur Transfektion wurde das Reagenz *TransIT[®]-LTI* (Mirus) verwendet. Dieses und alle weiteren Reagenzien wurden eine Stunde vor der Transfektion auf RT gebracht. Anschließend wurden 1,9ml Opti-MEM mit 11,5µg der endotoxinfreien Plasmid-DNA kräftig durchmischt und 60µl *TransIT[®]-LTI* 20 Minuten vor Ende der vierstündigen Inkubationszeit vorsichtig hinzu pipettiert sowie langsam vermischt. Dieser Ansatz wurde dann in Tropfen auf die Phoenix-Zellen gegeben. 24 Stunden später wurde das Medium der Zellen gewechselt um nach weiteren 24 Stunden sowie 48 Stunden den retroviralen Überstand der transfizierten Phoenix-Zellen zu ernten.

2.4.5.2 Retrovirale Transduktion von T-Zellen

Je 3,5ml des retroviralen Überstands wurden in einer 12-Lochplatte zu 4x10⁶ aktivierten T-Zellen in 500µl AIM-V[®]+10% HS gegeben. Zur Steigerung der Transduktionseffizienz wurden den T-Zellen 4µg/ml Polybren sowie 100U/ml IL-2 zugesetzt¹⁷². Analog zu Voss und Kollegen wurden die Platten, um die Viruspartikel und Zellen in räumlicher Nähe zu halten, zentrifugiert, für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und nach Inkubation mit dem zweiten retroviralem Überstand transduziert¹²⁸. Nach insgesamt 48 Stunden wurden die T-Zellen in einem Reaktionsgefäß aufgenommen, mit Medium resuspendiert und zentrifugiert. Der die retroviralen Partikel beinhaltende Überstand wurde abgenommen und die Zellen in

einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in einer Vertiefung einer 24-Lochplatte, mit 100U/ml IL-2 sowie $0,4 \times 10^5$ CD3/28 *Dynabeads* pro 1×10^6 T-Zellen in 2ml AIM-V®+10% HS ausgesät. Zwei bis drei Tage nach der Transduktion wurde die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch kontrolliert und die transduzierten T-Zellen auf Grund einer durch den Vektor vermittelten Puromycin-Resistenz, durch die Zugabe des Antibiotikums (5µg/ml) über drei Tage selektioniert. Daraufhin erfolgte eine erneute durchflusszytometrische Kontrolle der Rezeptorexpression.

2.4.5.3 T-Zell-Stimulation nach retroviraler Transduktion

Nach der erfolgreichen Transduktion wurden T-Zellen mit dem allo-HLA-DPB1-spezifischen TZR entweder über CD3/28 *Dynabeads* oder Antigen-spezifisch, mit bestrahlten (70Gy) allo-HLA-DP4 (HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01) transfizierten, autologen mDZs in einem mDZ zu T-Zell-Verhältnis von 1:10 stimuliert. Zu diesem Ansatz wurden des Weiteren autologe, mit 35Gy bestrahlte PBMZs (Verhältnis 1:1) und 100U/ml IL-2 sowie 5ng/ml IL-7 und -15 zugesetzt. Als Negativkontrolle wurden T-Zellen verwendet, die mit einem Kontroll-TZR transduziert wurden. Dieser TZR ist reaktiv gegen pp65₄₉₅₋₅₀₃ NLVPMVATV (kurz: NLV-Peptid), einem HLA-A2.1 restringierten Epitop des CMV-Proteins pp65. Nach erfolgreicher Transduktion wurden T-Zellen mit pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischem TZR mit NLV-Peptid beladenen T2-Zellen stimuliert. Für die Beladung von T2-Zellen mit dem NLV-Peptid wurden 1×10^6 Zellen in 100µl Standard Kulturmedium aufgenommen und mit 1ng/ml des Peptids (NLVMVATY) der Firma *JPT Peptide Technologies* für vier Stunden inkubiert. Nach einer Bestrahlung mit 100Gy wurde nicht gebundenes Peptid mit Standard Kulturmedium gewaschen und die T2-Zellen in einem Verhältnis von 1:5 sowie allogenen PBMZs (2:1, 35Gy) zur Stimulation der T-Zellen mit pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischem TZR verwendet. T-Zellen die mit den Leervektor transduzierten wurden (Mock), wurden durch ein auf die Stimulation mit dem anti-human CD3 Ak (OKT3) basierendes Expansionsprotokoll kultiviert. Hierfür wurden $5-7 \times 10^6$ T-Zellen in 30ml RPMI+10%HS aufgenommen. Pro 1×10^6 T-Zellen wurden der Suspension 1×10^7 mit 75Gy bestrahlte allogene PBMZs, 30ng/ml anti-human CD3 Ak, 300U/ml IL-2 sowie je 5ng/ml IL-7 und IL-15 zugegeben und in einer hochkant stehenden T75 Flasche im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

2.4.6 IFN-γ ELISpot

Die IFN-γ ELISpot (engl.: *enzyme-linked immunosorbent spot*) Analyse ist ein Verfahren um Zytokin-produzierende Zellen auf Einzelzellebene nachzuweisen¹⁷³. Hierfür wurde zunächst eine 96-Loch Mikrotiterplatte, die mit einer Polyvinylidenfluorid Membran ausgestattet ist,

durch 35%igen Ethanol aktiviert und mit je 150µl PBS drei Mal gewaschen. Diese Equilibrierung ermöglichte die Verankerung des primären Antikörpers anti-human-IFN- γ 1-D1K (10µg/ml in 60µl/Loch AIM-V[®]+10% HS) in der Membran. Nach 16 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ wurden nicht gebundene Ak mit je 200µl/Loch PBS in drei Waschschritten entfernt und unspezifische Bindungen durch eine einstündige Inkubation mit je 100µl/Loch AIM-V[®]+10% HS blockiert. Je nach Reaktivität wurden 1.000 bis 15.000 T-Zellen (in 50µl) in verschiedenen Verhältnissen zu den Zielzellen (in weiteren 50µl) in jede der Vertiefung der 96-Loch Mikrotiterplatte gegeben. Um den Einfluss verschiedener Oberflächenmoleküle (z.B. HLA-Klasse I, HLA-DQ, -DR oder -DP, sowie CD4) auf die Aktivierung der T-Zellen zu analysieren, wurden Zellen mit den entsprechenden blockierenden Antikörpern (siehe Tab. 2.16) für eine Stunde im Well vorinkubiert. Während einer 20-stündigen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ produzierten reaktive T-Zellen Antigen-spezifisch IFN- γ . Diese freigesetzten Zytokine binden an den primären, auf der Membran verankerten Ak. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen verworfen und die Platte insgesamt sechsmal mit PBS+0,05% Tween gewaschen. Mit 60µl eines sekundären Biotin-gekoppelten anti-human-IFN- γ 7-B6-1 (f.c. 2µg/ml, siehe Tab. 2.15) wurde das Zytokin innerhalb von zwei Stunden bei 37°C, 5% CO₂ markiert. Nach der Inkubation wurden ungebundene Ak durch erneutes, sechsmaliges Waschen entfernt und der Platte ein Peroxidase-Streptavidin Komplexes mit 100µl/Loch für eine Stunde zugegeben. Dieser bindet an den sekundär Biotin-gekoppelten Ak und diente damit dem optischen Nachweis von IFN- γ . Dieser Nachweis erfolgte nach erneuter Waschung (dreimal mit PBS+0,05% Tween sowie dreimal mit PBS) durch die Zugabe des AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)-Substrats, gelöst in Dimethylformamid mit 0,03% H₂O₂, welches als Substrat des Peroxidase-Streptavidin Komplex dient und durch diesen innerhalb von zehn Minuten zu einem rötlichen Farbstoff umgesetzt wird. Nach Abstoppen dieser Reaktion durch Wasser und ausreichender Trocknung konnten die dabei entstandenen Spots in einem CTL ELISpot Reader gezählt werden.

2.4.7 ⁵¹Chrom-Freisetzungsanalyse

Um die Zytotoxizität von T-Zellen zu bestimmen, wurde ein Verfahren verwendet, bei dem die ⁵¹Chrom-Freisetzung im Überstand zuvor chromierter Zielzellen (z.B. AML Blasten, Fibroblasten, Zelllinien) in einem definierten Zeitraum nach Zugabe von T-Zellen gemessen wird. Hierfür wurden 0,5x10⁶ Zielzellen (Zelllinien oder Fibroblasten) in 25µl FCS aufgenommen, mit 50µCi ⁵¹Cr versetzt und für 90 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Primären Leukämieblasten wurden dagegen in 50µl FCS mit 100µCi ⁵¹Cr für 120 Minuten

inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit je 10ml RPMI ohne Phenolrot gewaschen und 1.500 Zellen in 80µl RPMI ohne Phenolrot mit zugehörigem Serum in je eine Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte ausgesät. Hierzu wurden T-Zellen im angegebenen Effektor-zu-Zielzellen Verhältnis in 80µl des gleichen Mediums zugegeben, welche bei Bedarf durch Beifügung eines blockierenden Ak für eine Stunde vorinkubiert wurden. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Minimal- und Maximallyse 80µl Medium bzw. 80µl 2% Tween in je sechs Vertiefungen zu den chromierten Zellen gegeben. Nach vierstündiger Inkubation der Zelllinien und Fibroblasten sowie - im Fall der Blasten - nach fünf Stunden wurden die Zellen für fünf Minuten bei 1.000Upm ohne Bremse zentrifugiert, 80µl des Überstandes vorsichtig abpipettiert und auf eine 96-Loch LumaPlate gegeben. Die LumaPlate ist eine Mikrotiterplatte, deren Aussparungen mit Scintillationssubstanz gefüllt sind und die es erlaubt, die resultierende Gamma-Strahlung des Überstandes im Topcount®NXT™ zu messen. Nachdem die befüllte LumaPlate über Nacht an der Luft getrocknet wurde, konnte die ⁵¹Cr-Freisetzung im Überstand mit dem Topcount®NXT™ gemessen und der prozentuale Anteil lysierender T-Zellen mit folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{(\text{experimentell ermittelter Wert} - \text{Minimallyse})}{(\text{Maximallyse} - \text{Minimallyse})} \times 100 = \text{spezifische Lyse [\%]}$$

2.5 Mausversuche

Zur *in vivo* Testung der Leukämieaktivität der TZR modifizierten T-Zellen wurden NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, Bestandsnummer: 005557) Mäuse verwendet. Dieser Stamm kombiniert die reduzierte Funktion des angeborenen Zweigs des Immunsystems, bedingt durch den genetischen NOD/ShiLtJ Hintergrund¹⁷⁴, mit dem Fehlen reifer T- und B- Zellen durch die Funktionsverlustmutation des *Prkdc* Gens (*scid*-Mutation) sowie der durch den *knockout* des *Il2rg* Gens begründeten Mutation der IL-2-Rezeptor-γ-Kette. Dabei bildet diese Kombination die Grundlage für eine effektive Ansiedlung hämatopoetischer Stammzellen¹⁷⁴ und Leukämieblasten^{175,176}. Denn die Nullmutation der Gene der γ-Kette des IL2 Rezeptors, welche als Rezeptoren-Komponente sechs verschiedener Interleukine (IL-2, -4, -7, -9, -15, -21) fungiert, führt zu einer Blockade der durch diese Zytokine vermittelten Signalwege. Dabei führt der Defekt des IL-15 Signalwegs zum Ausbleiben der IL-15 abhängigen Entwicklung funktioneller NK-Zellen, welche die Hauptbarriere für das effiziente Anwachsen von Leukämieblasten bilden¹⁷⁴. Des Weiteren beeinflusst die Mutation des *Prkdc* Gens die Lymphozytenreifung durch den Funktionsverlust der DNA abhängigen Proteinkinase, die für die Reparatur doppelsträngiger DNA während des V(D)J-Genumlagerungsprozess zuständig

ist¹⁷⁷. Darüber hinaus spielt sie auch bei der Destabilisierung der hämatopoetischen Stammzellen der Maus eine Rolle¹⁷⁸, wodurch das Anwachsen von humanen hämatopoetischen Zellen in der so entstandenen Knochenmarksnische unterstützt wird^{178,179}. Des Weiteren wird durch Mutation des SCF Genortes die Expression des Zytokins SCF induziert, welches für das Anwachsen, die Proliferation sowie das Überleben der humanen AML Blasten eine wichtige Rolle spielt¹⁷⁹.

Die Tiere stammen aus den Jackson Laboratorien und wurden unter den vom Dachverband der europäischen Gesellschaft für Versuchstierkunde festgelegten, spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) in den zentralen Tierlaboratorien des Uniklinikums Regensburg gezüchtet.

2.5.1 Zelltransfer in NSG Mäuse

Zur *in vivo* Testung von T-Zellen wurden zunächst sechs bis zwölf Wochen alte, weibliche Tiere mit einer subletalen Dosis von 1,5Gy bestrahlt (Abb. 2.2). Sechzehn Stunden nach der Bestrahlung erfolgte die intravenöse (i.v., über die Schwanzvene) Applikation von humanen AML Blasten in 200µl PBS. Zwei Arten von *in vivo* Testungen können dabei unterschieden werden. Zunächst erfolgte die Titration der nötigen Blastenzahl, um nach 21 Tagen im murinen Knochenmark einen prozentualen humanen Blastenanteil von 2-6% zu erreichen. Hierfür wurden vier verschiedenen Mausgruppen gebildet, denen je eine andere Blastendose (1×10^5 ; $2,5 \times 10^5$; 5×10^5 ; 1×10^6) injiziert wurde. Die Blastendose, mit der innerhalb 21 Tagen ein Blastenanteil von 2-6% erzielt wurde, fand in den weiteren *in vivo* Versuchen zur Testung der Effizienz von T-Zellen mit Leukämie-reaktiven TZR Anwendung. Für diese Untersuchung wurde die zuvor ermittelte Zellzahl am Tag 0 in sublethal bestrahlte Mäuse injiziert. 21 Tage nach der Blasteninjektion wurde pro Maus 1×10^7 T-Zellen zusammen mit 1.000U hIL-2 sowie 20µg Fc-hIL-7 appliziert. Nach weiteren sieben Tagen wurden die Mäuse geopfert und das Knochenmark sowie die Milz auf die Leukämielast und die Persistenz der transferierten T-Zellen durchflusszytometrisch überprüft.

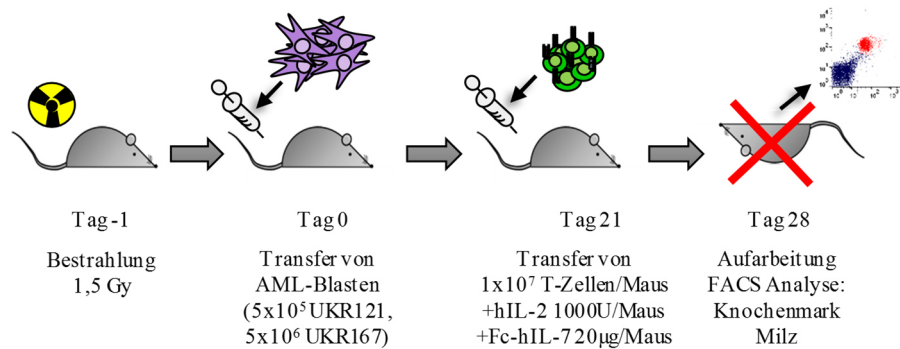


Abb. 2.2.: Schematische Darstellung der *in vivo* Testung. Dargestellt ist der zeitliche Ablauf des Experiments in Tagen. NSG Tiere wurden zunächst sublethal mit 1,5Gy bestrahlt. Nach 16 Stunden (Tag 0) wurden eine zuvor durch die Titration ermittelte Blastenmenge i.v. injiziert. Nach 21 Tagen wurde das Anwachsen der AML-Blasten in einer kleinen Gruppe von Tieren mittels Durchflusszytometrie analysiert und die TZR modifizierte T-Zellen zusammen mit 1000U/Maus hIL-2 und 20µg/Maus Fc-hIL-7 i.v. injiziert. An Tag 28 nach der AML Injektion wurden die Tiere geopfert und die prozentuale Häufigkeit der CD33⁺/CD45⁺ Blasten sowie die Anwesenheit der T-Zellen in Knochenmark und Milz untersucht. Abgeändert nach Herr und Kollegen¹⁸⁰. i.v.: intra venös, Gy.: Gray, NSG.: NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ.

2.5.2 Aufarbeitung von Knochenmark und Milz zur phänotypischen Untersuchung

Die Milz sowie die Knochen eines der Hinterläufe wurden aus den getöteten Mäusen entnommen und in ein mit kaltem Präparationsmedium gefülltes Reaktionsgefäß bis zur Aufarbeitung auf Eis gelagert. Die Milz wurde daraufhin von Fettresten befreit und durch einen Filter mit einer Porengröße von 100µm in ein 50ml Reaktionsgefäß gedrückt. Der Filter wurde anschließend mit weiteren 5ml Präparationsmedium gewaschen. Das Femur und die Tibia eines Mausbeins wurden von dem umgebenden Gewebe befreit, auf beiden Seiten geöffnet und das Knochenmark mit Hilfe einer Kanüle (Ø 0.4x19mm) aus dem Knochen gespült. Das Knochenmark wurde anschließend durch einen befeuchteten Filter (100µm) gepresst und mit 5ml Präparationsmedium gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1.500Upm wurde das Zellpellet durch eine 2-minütige Inkubation mit 2ml Lyse-Puffer (1:10 in Aqua dest. verdünnt) von Erythrozyten befreit. Nach Abstoppen dieser Reaktion durch 8ml Präparationsmedium wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in einem Volumen von 1ml aufgenommen und je 100µl Zellsuspension mit CD3, CD4/CD8 und CD45 spezifischen mAk zur Identifikation von T-Zellen sowie in einer separaten Färbung mit CD3, CD33 und CD45 spezifischen mAk zur Analyse des Blastenanteils gefärbt. Zur Kontrolle sowie zur Kompensation der verschiedenen Fluorochrome wurden Zellen verschiedener Mäuse vereint. Diese Zellpools wurden dann entweder ungefärbt verwendet, für die Kompensation passend gefärbt oder als Isotypkontrolle mit Fluorochrom-markierten Isotypen markiert.

2.6 Statistische Methoden

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism Software Version 6.04 für Windows durchgeführt. Angewandte statistische Analysen sowie P-Werte wurden in jeder

Abbildungsunterschrift individuell angegeben, wobei ein Wert von $p \leq 0.05(*)$ als signifikant betrachtet wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Isolation und Klonierung von allo-HLA-DPB1-spezifischen TZR aus humanen Leukämie-reaktiven CD4⁺ T-Zell-Klonen

Zur Isolation von allo-HLA-DPB1-spezifischen TZR wurden die Leukämie-reaktiven T-Zell-Klone 2C4, 1F3 und 11C12 aus der Doktorarbeit von Yvonne Eichinger, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Herr als Ausgangsmaterial verwendet^{180,181}. Diese Klone wurden in einer allogenen gemischten Lymphozyten-Leukämie-Kultur (engl.: *mixed lymphocyte reaction*, MLR) generiert, in der phänotypisch naïve CD4⁺ T-Zellen des 10/10 HLA-identen Stammzellspenders (d.h. Spender und Patient waren identisch für HLA-A, -B, -C, -DR und -DQ) mit HLA-DPB1 differentiellen primären AML Blasten eines Patienten stimuliert wurden (siehe Tab. 3.1)¹⁸⁰. Nach mehrwöchiger Stimulation konnten aus diesen Kulturen CD4⁺ T-Zell-Klone mit Spezifität gegen eines der allogenen (allo-) HLA-DPB1 Allele des Patienten isoliert werden, die darüber hinaus in der Lage waren, primäre AML Blasten des Patienten *in vitro* aber auch *in vivo* effektiv zu lysieren^{180,181}.

Tab. 3.1.: Ursprung der T-Zell-Klone aus den allogenen gemischten Lymphozyten-Leukämie-Kulturen. Die T-Zell-Klone 2C4, 1F3 und 11C12 sind durch verschiedene HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ idente, jedoch HLA-DPB1 differente Spender/Patienten Kulturen entstanden. Dargestellt sind die anonymisierten Nummern der Patienten sowie der Spender, vergeben durch die Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz sowie das HLA-DP Allel als Restriktionselement des jeweiligen T-Zell-Klons^{180,181}.

Name des T-Zell-Klons	Spender	Patient	Restriktionselement
2C4	Don671	MZ921	HLA-DPB1*14:01
1F3	Don974	MZ747	HLA-DPB1*06:01
11C12	Don595	MZ683	HLA-DPB1*04:01

Bis heute ist die Generierung von Antigen-spezifischen T-Zellen für den adoptiven Transfer mit einem sehr hohen zeitlichen und materiellen Aufwand verbunden. Zusätzlich nimmt die Wirksamkeit von T-Zellen in Langzeitkulturen mit der Zeit ab¹²⁰. Daher ist die Isolation von TZR-Sequenzen Leukämie-reaktiven T-Zell-Klonen sowie deren Transfer in T-Zellen eine Möglichkeit zur Überwindung dieser Hindernisse. Zur Übertragung der allo-HLA-DPB1-Spezifität der CD4⁺ T-Zell-Klone 2C4, 1F3 und 11C12 auf T-Zellen gesunder Spender sollten deswegen die Gensequenzen der α - und β -Polypeptidkette der allo-HLA-DPB1 spezifischen TZR (TZR_{DPB1}) isoliert und identifiziert werden. Hierfür wurde zunächst RNA aus den CD4⁺ T-Zell-Klonen isoliert, mittels Standardverfahren in cDNA umgeschrieben und schließlich mittels einer nach Birkholz und Kollegen modifizierten RACE PCR Methode die TZR-Gensequenzen der jeweiligen T-Zell-Klone amplifiziert (siehe Kapitel 2.2.2)¹³⁶. Nach Sequenzierung der amplifizierten TZR_{DPB1} Gensequenzen erfolgt die Bestimmung der TZR_{DPB1} V α bzw. V β -Subfamilien-Zugehörigkeit und der Nomenklatur mit Hilfe eines Datenabgleichs mit der IMGT (ImMunoGeneTics) Datenbank¹⁸² sowie mit der Nomenklatur nach Arden¹⁸³.

(Tab. 3.2). Hinsichtlich der TZR_{DPB1} V β -Subfamilien-Zugehörigkeit ergab sich, dass der TZR_{DPB1}*14:01 des CD4⁺ T-Zell-Klons 2C4 das V-Segment V β 13.6 besitzt, der aus dem T-Zell-Klon 1F3 isolierte TZR_{DPB1}*06:01 V β 2 positiv ist und der TZR_{DPB1}*04:01, isoliert aus dem CD4⁺ T-Zell-Klone 11C12, durch die V β 13.2 Subfamilie charakterisiert wird.

Tab. 3.2.: Übersicht der TZR charakterisierenden Elemente der isolierten TZR_{DPB1}-Ketten der T-Zell-Klone 2C4, 1F3 und 11C12. Detaillierte Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Nomenklatur der TZR_{DPB1} (Komplex aus TZR α - und TZR β -Kette), den TZR_{DPB1} definierenden V (*variablen*)-, D (*Diversitäts*)-, J (*junktionalen*)-Segmenten sowie der CDR3 (engl.: *complementarity determining region 3*) Region der variablen Domäne und die Zugehörigkeit der konstanten Domäne der β -Kette (C β 1 bzw. C β 2). Nomenklatur nach der Datenbank IMGT (ImMunoGeneTics)¹⁸² sowie, einzig im Fall der V-Segmente, nach Arden¹⁸³.

CD4 ⁺ T-Zell- Klon	Nomenklatur des TZR	Allogenes Restriktions- element	Kette	Variable Domäne					Konstante Domäne
				V-Segment		D- Segment nach IMGT ¹⁸²	J- Segment nach IMGT ¹⁸²	CDR3 Aminosäure- sequenz	
				Nach IMGT ¹⁸²	nach Arden ¹⁸³				
2C4	TZR _{DPB1} *14:01	HLA- DPB1*14:01	α- Kette	TRAV26-2	Vα4	-	TRAJ54	CSAQIIQGA QKLVF	Cβ1
			β- Kette	TRBV6-6	Vβ13.6	TRBD1	TRBJ1-2	CASSPRGL GGYTF	
1F3	TZR _{DPB1} *06:01	HLA- DPB1*06:01	α- Kette	TRAV21	Vα23	-	TRAJ24- 02	CAVKWDS WGKLQF	Cβ2
			β- Kette	TRBV20-1	Vβ2	TRBD2	TRBJ2-3	CSAERWTS GGSDTQYF	
11C12	TZR _{DPB1} *04:01	HLA- DPB1*04:01	α- Kette	TRAV13-2	Vα8.2	-	TRAJ9	CAENEGGG FKTIF	Cβ2
			β- Kette	TRBV6-2	Vβ13.2	TRBD1	TRBJ1-1	CASSYSTPT LNTEAFF	

Nach Sequenzierung und Charakterisierung der isolierten TZR_{DPB1} Gensequenzen sollte überprüft werden, ob die drei TZR_{DPB1} jeweils in Zelllinien sowie in allogenen Spender T-Zellen exprimiert werden können. Um eine Expression des TZR_{DPB1} in einer Zelle zu erreichen, wurde die Methode der Einbringung des TZR_{DPB1} durch die Transfektion mit IVT RNA gewählt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin begründet, dass die RNA, die mittels Elektroporation in das Zytoplasma der Zelle transferiert wird, sofort translatiert werden kann. Somit können *in vitro* Analysen zur Testung eines TZR_{DPB1} sehr schnell durchgeführt werden. Die TZR_{DPB1} Expression der mit IVT RNA transfizierten Zellen ist jedoch auf Grund der limitierten Menge der durch die Elektroporation übertragenen RNA und deren kurzer Halbwertszeit nur transient^{135,184}. Deshalb wurden folgende Experimente immer im Zeitraum der höchsten Expression, also 14 Stunden nach Transfektion, durchgeführt. Um IVT RNA generieren zu können, mussten zunächst die Sequenzen der einzelnen TZR-Ketten der drei TZR_{DPB1} über Restriktionsschnittstellen (XbaI/XhoI für TZR_{DPB1}*04:01 und TZR_{DPB1}*14:01, EcoRI/XhoI für TZR_{DPB1}*06:01) jeweils in einen RNA-"Produktionsvektor" pGEM4Z-64A kloniert werden¹⁵⁹. Nach Linearisierung, Aufreinigung und Amplifikation der RNA der TZR_{DPB1}-Ketten (siehe Kapitel 2.2.12, 2.2.13, 2.2.14) konnten die α - sowie die dazugehörige β -Kette eines TZR_{DPB1} durch Elektroporation in die T-Zelllinie Jurkat76 sowie CD3/28 stimulierte T-Zellen eingebracht werden (siehe Kapitel 2.4.4). Anhand der

durchflusszytometrischen Detektion der variablen Domäne der β -Kette des jeweiligen TZR_{DPB1} (siehe Tab. 3.2) konnte die Transfektionseffizienz untersucht werden (siehe Kapitel 2.4.3).

Die für die Ermittlung der Transfektionseffizienz zunächst verwendete Zelllinie Jurkat76 ist eine immortalisierte T-Zelllinie einer humanen ALL, die als $\alpha\beta$ -TZR defizient beschrieben wurde und somit keinen endogenen TZR besitzt¹⁶³. Durch die RNA-Transfektion wurden beide TZR_{DPB1}-Ketten ($\alpha+\beta$) von je einem der drei Rezeptoren TZR_{DPB1}*14:01, TZR_{DPB1}*06:01 und TZR_{DPB1}*04:01 einzeln in die T-Zelllinie Jurkat76 eingebracht. Daraufhin wurde die Oberflächenexpression der drei TZR_{DPB1} transfizierten Jurkat76 Ansätze analysiert. Hierfür wurden die Zellen mit dem jeweiligem TZR_{DPB1} V β -Subfamilien-spezifischen mAk sowie dem T-Zell-Marker anti-CD3 mAk markiert und durchflusszytometrisch untersucht. Für alle drei Rezeptoren konnte eine starke Expression des jeweiligen TZR_{DPB1} erzielt werden (Abb. 3.1; MFI (mediane Fluoreszenzintensität) des V β -Subfamilien-spezifischen mAk: TZR_{DPB1}*14:01: 58; TZR_{DPB1}*06:01: 71; TZR_{DPB1}*04:01: 42).

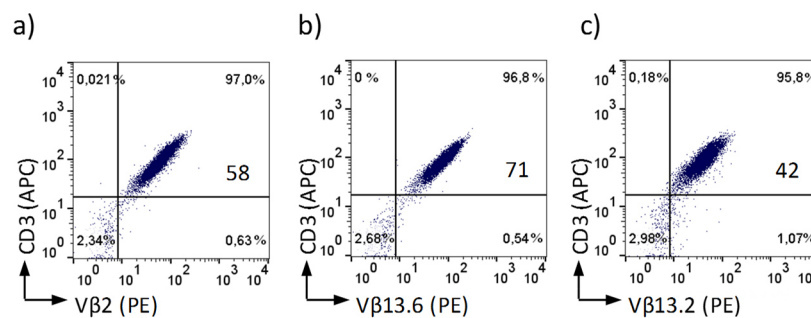


Abb. 3.1.: Expression der allo-HLA-DPB1-reaktiven TZR in der T-Zelllinie Jurkat76. Die T-Zelllinie Jurkat76 (5×10^6 Zellen pro Transfektionsansatz) wurde mit *in vitro* transkribierter RNA (je $10 \mu\text{g}$ pro TZR-Kette) kodierend für die allo-HLA-DPB1-reaktiven Rezeptoren (a) TZR_{DPB1}*14:01, (b) TZR_{DPB1}*06:01 und (c) TZR_{DPB1}*04:01 transfiziert. Der Expressionsnachweis wurde 14 Stunden nach Elektroporation mittels Durchflusszytometrie anhand des jeweiligen TZR_{DPB1} V β -Subfamilien-spezifischen Antikörpers (PE) und CD3 (APC) durchgeführt. Angegeben ist die Prozentzahl der CD3⁺V β ⁺ T-Zellen im rechten oberen Quadranten des Punktediagramms sowie die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der V β -Expression.

Um den Effekt endogen vorhandener TZR auf die Expression der eingebrachten TZR_{DPB1} zu analysieren, wurden im nächsten Schritt T-Zellen gesunder Spender mit TZR_{DPB1} kodierender RNA transfiziert. Hierfür erfolgte zunächst eine Isolation von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen aus PBMZs eines gesunden Spenders (siehe Kapitel 2.4.1). Die T-Zellen wurden daraufhin sieben Tage mit CD3/28 Beads sowie den Zytokinen IL-2, -7 und -15 (siehe Kapitel 2.4.2) stimuliert und anschließend einzeln jeweils mit der *in vitro* transkribierten RNA der drei verschiedenen TZR_{DPB1}-Ketten-Paare durch Elektroporation transfiziert. Die Analyse der Oberflächenexpression des TZR_{DPB1} erfolgte erneut über die durchflusszytometrische Detektion der V β -Expression auf den T-Zellen, die zusätzlich mit den T-Zell-Subfamilien spezifischen Markern CD4 oder CD8 gefärbt wurden (Abb. 3.2). Für nahezu alle transfizierten CD4⁺ (MFI des V β -Subfamilien-spezifischen mAk: TZR_{DPB1}*14:01: 178; TZR_{DPB1}*06:01: 81; TZR_{DPB1}*04:01: 62)

und CD8⁺ (MFI des V β -Subfamilien-spezifischen mAk: TZR_{DPB1*14:01}: 116; TZR_{DPB1*06:01}: 56; TZR_{DPB1*04:01}: 41) T-Zellen konnte eine Expression des jeweils eingebrachten allo-HLA-DPB1-spezifischen TZR auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Wohingegen nicht mit RNA transfizierte T-Zellen (Mock), die als Kontrolle der endogenen Expression des TZR mit analysiert wurden, den jeweiligen TZR_{DPB1} nur in sehr geringem Maßen exprimieren (MFI der endogenen TZR-Expression mit V β -Subfamilien Zugehörigkeit in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Durchschnitt zwischen 4 und 6).

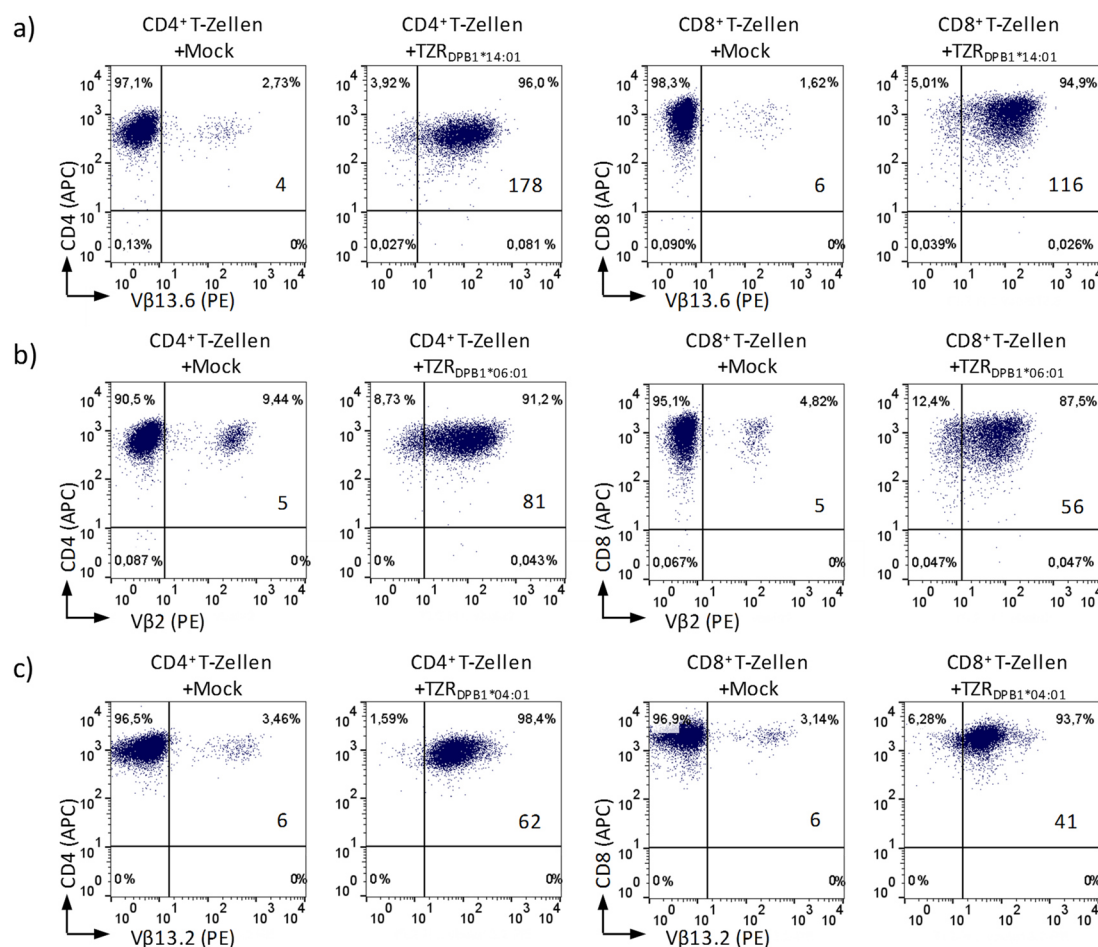


Abb. 3.2.: Expression der allo-HLA-DPB1-reaktiven TZR in humanen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Verwendete CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden aus PBMZ beliebiger, gesunder Spender ((a) Don86, (b) Don89, (c) Don94) mittels magnetischer Zellseparation isoliert, in 2ml AIM-V+10% HS in einer Vertiefung einer 24-Lochplatte ausgesät, mit 100U/ml IL-2, 5ng/ml IL-7 sowie IL-15 versetzt und mit 0,2x10⁶ CD3/28 *Dynabeads* pro 1x10⁶ T-Zellen/ml für sieben Tage stimuliert. 1x10⁷ CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden an Tag 7 der Stimulation mittels Elektroporation ohne (Mock) bzw. mit *in vitro* transkribierter RNA (je 10µg pro TZR-Kette) eines allo-HLA-DPB1-reaktiven TZR ausgestattet. Die Effizienz der Transfektion der T-Zellen mit (a) TZR_{DPB1*14:01}, (b) TZR_{DPB1*06:01} und (c) TZR_{DPB1*04:01} wurde 14 Stunden nach Einbringung der TZR-Sequenzen durchflusszytometrisch anhand des jeweiligen TZR V β -Subfamilien-spezifischen Antikörpers (PE) und CD4 (APC) bzw. CD8 (APC) durchgeführt. Als Kontrolle der endogenen Expression des TZR_{DPB1} des Spenders wurde die V β -Expression der T-Zellen ohne RNA (Mock) analysiert. Angegeben sind in repräsentativen Punktdiagrammen die Prozentzahl der CD4⁺V β ⁺ bzw. CD8⁺V β ⁺ T-Zellen im rechten oberen Quadranten des jeweiligen Punktdiagrammes und die MFI der V β -Expression.

Auf Grund der transienten Art der Transfektion konnte ab Tag 5 bzw. 6 nach der Elektroporation nur noch eine geringe Rezeptorexpression gemessen werden. So senkte sich die Expression des TZR_{DPB1*14:01} in CD4⁺ T-Zellen, ermittelt durch die Analyse der MFI des

V β 13.6 Subfamilien-spezifischen mAk, von einem Wert von 177, ermittelt 14 Stunden nach Transfektion, auf einen Wert von fünf, 158 Stunden nach Transfektion (als repräsentatives Ergebnis in Abb. 3.3a dargestellt) sowie von 116 auf fünf im Fall der TZR_{DPB1*14:01} Expression TZR_{DPB1*14:01} transfizierter CD8⁺ T-Zellen. Ergebnisse anderer Rezeptoren sind in Abb. 3.3b gezeigt.

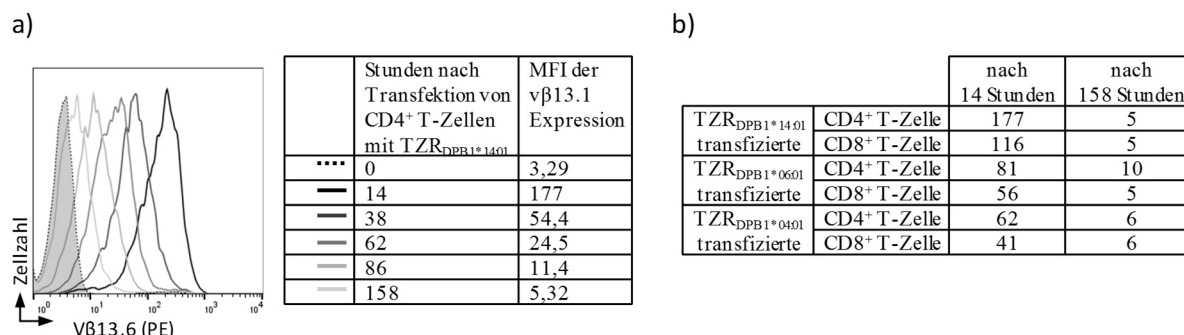


Abb. 3.3.: Expressionskinetik des TZR_{DPB1*14:01} auf humanen CD4⁺ T-Zellen. Verwendete CD4⁺ T-Zellen wurden aus PBMZ gesunder Spender (Donor 86), wie in Abb. 3.2 beschrieben isoliert, stimuliert und TZR_{DPB1*14:01} transfiziert. (a) Durchflusszytometrische Analyse der V β 13.6 (PE)-Expression wurden 0, 14, 38, 62, 86 und 158 Stunden nach Einbringung der TZR-Sequenzen durchgeführt. Dargestellt sind die Histogramme der V β 13.6-Expression zu den verschiedenen Zeitpunkten in einem Diagramm sowie die MFI der V β 13.6-Expression in der danebenliegenden Tabelle. (b) Aufgezeigt ist die MFI der V β -Expression der verschiedenen Rezeptoren von TZR_{DPB1} transfizierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen 14 Stunden sowie 158 Stunden nach Transfektion.

3.2 Funktionelle Charakterisierung TZR_{DPB1} transfizierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mittels IFN- γ ELISpot

Um zu überprüfen, ob die starke Expression der allo-HLA-DPB1-reaktiven TZR auf transfizierten T-Zellen auch zu einer allo-HLA-DPB1-spezifischen Erkennung führt, wurde in einer ELISpot-Testung die Fähigkeit der T-Zellen, Antigen-spezifisch IFN- γ zu sezernieren, analysiert. Als Zielzelle der Testung der allo-HLA-DPB1-Spezifität von T-Zellen mit eingebrachtem TZR_{DPB1} dienten EBV-LCLs. Diese Zelllinien wurden aus HLA-typisierten Spender- und Patientenzellen der ursprünglichen MLR, aus welcher die T-Zell-Klone und damit auch die hier verwendeten TZR_{DPB1} stammen, generiert (siehe Tab. 3.1). Die EBV-LCLs der in der MLR verwendeten AML-Patienten (MZ921, MZ747 bzw. MZ683) exprimieren das allogene HLA-DPB1 Molekül (HLA-DPB1*14:01, 06:01 bzw. 04:01), also das Restriktionselement der allo-HLA-DPB1 spezifischen TZR (TZR_{DPB1*14:01}, TZR_{DPB1*06:01} bzw. TZR_{DPB1*04:01}) und sollten damit von den TZR_{DPB1} transfizierten T-Zellen spezifisch erkannt werden. Sie werden im Folgenden allgemein als allo-HLA-DPB1⁺ EBV-LCLs bzw. im spezifischen Fall als allo-HLA-DPB1*14:01⁺ EBV-LCL-MZ921, allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747 bzw. allo-HLA-DPB1*14:01⁺ EBV-LCL-MZ683 bezeichnet (siehe Tab. 3.3). Da die EBV-LCLs der in der MLR verwendeten T-Zell-Spender (Don671, Don974 bzw. Don595) das allogene HLA-DPB1 Moleküle nicht exprimieren, sollten diese folglich von

TZR_{DPB1} transfizierten T-Zellen nicht erkannt werden. Sie werden im Allgemeinen als allo-HLA-DPB1⁻ EBV-LCLs bzw. im spezifischen Fall allo-HLA-DPB1*14:01⁻ EBV-LCL-Don671, allo-HLA-DPB1*06:01⁻ EBV-LCL-Don974 bzw. allo-HLA-DPB1*04:01⁻ EBV-LCL-Don595 bezeichnet.

Tab. 3.3.: Nomenklatur der verwendeten EBV-LCLs. Der Name der verwendeten EBV-LCLs ergibt sich aus dem Restriktionselement des zugehörigen TZR_{DPB1} sowie der Bezeichnung der Spender bzw. Patienten aus deren Zellen die EBV-LCLs generiert wurden.

Name des isolierten TZR	Spender-nummer	Bezeichnung der EBV-LCLs	Patient-nummer	Bezeichnung der EBV-LCLs
TZR _{DPB1} *14:01	Don671	allo-HLA-DPB1*14:01 ⁻ EBV-LCL-Don671	MZ921	allo-HLA-DPB1*14:01 ⁺ EBV-LCL-MZ921
TZR _{DPB1} *06:01	Don974	allo-HLA-DPB1*06:01 ⁻ EBV-LCL-Don974	MZ747	allo-HLA-DPB1*06:01 ⁺ EBV-LCL-MZ747
TZR _{DPB1} *04:01	Don595	allo-HLA-DPB1*04:01 ⁻ EBV-LCL-Don595	MZ683	allo-HLA-DPB1*04:01 ⁺ EBV-LCL-MZ683

In mehrere IFN- γ ELISpot Analysen, in denen TZR_{DPB1} sowie Mock transfizierte CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen mit allo-HLA-DPB1⁺ bzw. allo-HLA-DPB1⁻ EBV-LCLs inkubiert wurden, konnten die in Abb. 3.4 dargestellten Ergebnisse erzielt werden. Zum einen zeigte sich, dass CD4⁺ T-Zellen, die für sieben Tage mit CD3/28-Beads aktiviert und dann mit TZR_{DPB1} RNA transfiziert wurden, allo-HLA-DPB1⁺ EBV-LCLs erkennen (Abb. 3.4). So ergibt die IFN- γ Analyse TZR_{DPB1}*14:01 transfizierter CD4⁺ T-Zellen bei einer Stimulation mit der allo-HLA-DPB1*14:01⁺ EBV-LCL-MZ921 274 Spots/1,5x10⁴ T-Zellen (Abb. 3.4a), TZR_{DPB1}*06:01 transfizierte CD4⁺ T-Zellen bei einer Stimulation mit der allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747 562 Spots/1,5x10⁴ T-Zellen (Abb. 3.4b) und TZR_{DPB1}*04:01 transfizierte CD4⁺ T-Zellen bei einer Stimulation mit der allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 510 Spots/1,5x10⁴ T-Zellen (Abb. 3.4c). Hierbei wiesen die TZR_{DPB1}*14:01 transfizierten CD4⁺ T-Zellen die schwächste IFN- γ Freisetzung auf (Abb. 3.4a). Die allo-HLA-DPB1*14:01⁻ EBV-LCL-Don671 bzw. allo-HLA-DPB1*06:01⁻ Don974 wurden im Fall der TZR_{DPB1}*14:01 bzw. TZR_{DPB1}*06:01 transfizierten CD4⁺ T-Zellen nur schwach erkannt (Abb. 3.4a und b). Dagegen ergab die Kokultur der TZR_{DPB1}*04:01 transfizierten CD4⁺ Lymphozyten mit der allo-HLA-DPB1*04:01⁻ EBV-LCL-Don595 eine erhöhte IFN- γ -Spot Anzahl (Abb. 3.4c). Diese Aktivität der T-Zellen ist am ehesten durch eine EBV-Reaktivität der Spender T-Zellen zu erklären, die sich durch längere Kultivierung der T-Zellen vor der *in vitro* Testung nivellieren lässt (Daten nicht gezeigt). Mock transfizierte CD4⁺ T-Zellen, die nur ihren endogenen TZR tragen, zeigten eine geringe IFN- γ Freisetzung nach Inkubation mit allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCLs sowie allo-HLA-DPB1*04:01⁻ EBV-LCLs.

Neben der Funktionalität der CD4⁺ T-Zellen sollte des Weiteren geklärt werden, ob die HLA-Klasse II restringierten TZR_{DPB1} in der Lage sind, auch in CD8⁺ T-Zellen eine allo-HLA-DPB1-spezifische Immunantwort zu vermitteln. Einzig TZR_{DPB1}*04:01 transfizierte

CD8⁺ T-Zellen sezernieren IFN- γ bei Kontakt mit der allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 (478 Spots pro $1,5 \times 10^4$ T-Zellen), während Mock transfizierte T-Zellen mit 54 Spots bei $1,5 \times 10^4$ T-Zellen diese nicht erkannten (Abb. 3.4c). TZRD_{DPB1}*14:01 bzw. TZRD_{DPB1}*06:01 transfizierte CD8⁺ T-Zellen sezernieren nur in geringem Maße IFN- γ nach Inkubation mit der allo-HLA-DPB1*14:01⁺ EBV-LCL-MZ921 bzw. allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747.

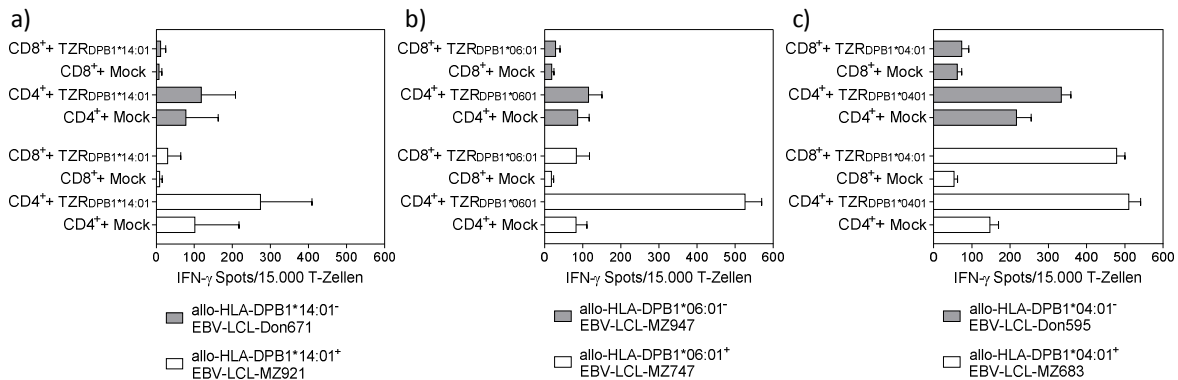


Abb. 3.4.: Funktionelle Testung TZR-RNA transfizierter T-Zellen gegen EBV-LCLs. Verwendete CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden aus PBMZ gesunder Spender, wie in Abb. 3.2 beschrieben isoliert, stimuliert und Mock, TZRD_{DPB1}*14:01, TZRD_{DPB1}*06:01 oder TZRD_{DPB1}*04:01 transfiziert. 14 Stunden nach Elektroporation wurden die verschiedenen Transfektionsansätze in einem 20 Stunden IFN- γ ELISpot eingesetzt. Hierfür wurden $1,5 \times 10^4$ TZRD_{DPB1}- oder Mock-transfizierte CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen mit 5×10^4 Zielzellen in einer Vertiefung einer 96-Loch-ELISpot-Mikrotiterplatte inkubiert. Die Zielzellen waren die (a) allo-HLA-DPB1*14:01⁺ EBV-LCL-MZ921 (□) und die allo-HLA-DPB1*14:01⁺ EBV-LCL-Don671 (■); (b) die allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747 (□) und die allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-Don974 (■) sowie (c) die allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 (□) und die allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-Don595 (■). Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei (TZRD_{DPB1}*14:01, T-Zell-Spender Donor 86 und 89), drei (TZRD_{DPB1}*06:01, T-Zell-Spender Donor 86, 89 und 94) bzw. vier (TZRD_{DPB1}*04:01, T-Zell-Spender Donor 89, 94, 100 und 109) transfizierten T-Zell-Spendern mit je zwei technischen Replikaten, \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM, engl.: *standard error of mean*).

Dass die Reaktivität der TZRD_{DPB1} transfizierten T-Zellen, analog der ursprünglichen T-Zell-Klone, ausschließlich gegen HLA-DP gerichtet ist¹⁸¹, konnte in einer IFN- γ ELISpot Analyse bestätigt werden. Hierfür wurden allo-HLA-DPB1⁺ EBV-LCL unter diverser HLA Blockade mit CD4⁺ T-Zellen allogener Spender, die durch RNA-Transfektion mit den TZRD_{DPB1} ausgestattet wurden, kultiviert. Dargestellt am Beispiel des TZRD_{DPB1}*04:01. Durch die Inkubation der allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 mit HLA-Klasse I (Klon: W6/32), HLA-DR (Klon: HB55), -DQ (Klon: SPV-L3) bzw. -DP (Klon: B7/21) blockierenden Antikörpern vor der ELISpot Analyse sollte die Interaktion des pHLA-Komplexes mit dem TZRD_{DPB1}*04:01 während der Testung verhindert werden. Die IFN- γ Spotanzahl nach Blockade der Erkennung der HLA-Klasse I bzw. HLA-DR sowie -DQ Moleküle des allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 durch TZRD_{DPB1}*04:01 transfizierte CD4⁺ Lymphozyten lag zwischen 271 und 313 Spots pro 5×10^3 T-Zellen (Abb. 3.5). Damit war sie ebenso hoch wie die Anzahl der IFN- γ Spots der ELISpot Analyse unter Verwendung der allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 und TZRD_{DPB1}*04:01 transfizierten CD4⁺ T-Zellen ohne den Einsatz HLA-blockierender

Antikörper. Blockierte man jedoch die Interaktion des HLA-DP-Moleküls mit dem TZR_{DPB1*04:01} der transfizierten CD4⁺ Lymphozyten, führte dies im IFN- γ ELISpot zu einer Spotreduktion von 333 auf 62 Spots pro 5x10³ T-Zellen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der TZR_{DPB1*04:01} HLA-DP restringiert ist und ausschließlich Zielzellen, die das allo-HLA-DPB1*04:01 tragen, erkennt.

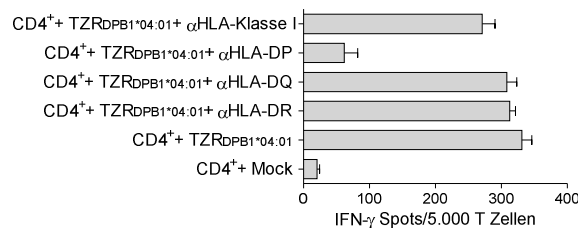


Abb. 3.5.: HLA-DP-spezifische Erkennung allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 durch TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ T-Zellen. Verwendete CD4⁺ T-Zellen wurden aus PBMZ gesunder Spender, wie in Abb. 3.2 beschrieben isoliert, stimuliert und Mock, oder TZR_{DPB1*04:01} transfiziert. Nach 14 Stunden Inkubation wurden die transfizierten T-Zellen in einem 20 Stunden IFN- γ ELISpot eingesetzt. Hierfür wurden 5x10³ T-Zellen mit 5x10⁴ allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 in einer Vertiefung einer 96-Loch-ELISpot-Mikrotiterplatte kokultiviert. Zur Kontrolle der HLA Restriktion wurden allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 für eine Stunde mit blockierenden, monoklonalen Antikörpern gegen HLA-Klasse I (Klon: W6/32), HLA-DR (Klon: HB55), -DQ (Klon: SPV-L3) oder -DP (Klon: B7/21) (Tab. 2.15) in sättigenden Konzentrationen inkubiert. Dargestellte Daten sind Resultate eines Experimentes mit einem T-Zell-Spender (Donor 95) mit je zwei technischen Replikaten \pm SEM.

Im Gesamten zeigen die funktionellen Untersuchungen der TZR_{DPB1} transfizierten T-Zellen mittels der IFN- γ ELISpot Analyse, dass alle drei TZR_{DPB1}, wie auch die T-Zell-Klone aus denen sie isoliert wurden, HLA-DPB1 restringiert sind, wobei jedoch die T-Zellen je nach transfizierten TZR_{DPB1} unterschiedlich stark IFN- γ freisetzen. So zeigt der aus dem T-Zell-Klon 2C4 stammende TZR_{DPB1*14:01} zwar eine HLA-DPB1*14:01 spezifische Erkennung, jedoch ließ dieser im Vergleich mit den anderen TZR_{DPB1} die geringste Reaktivität nach Transfer in T-Zellen gesunder Spender erkennen. Auch ist das Allel HLA-DPB1*14:01 mit einer Frequenz von 1,17% ausschließlich in einer Minderheit der kaukasischen Bevölkerung vertreten¹⁰⁴. Daher wurde in dieser Arbeit mit diesem Rezeptor nicht weitergearbeitet. Der TZR_{DPB1*06:01} ist zwar mit einer Frequenz von 1,83% nicht wesentlich häufiger in der kaukasischen Bevölkerung vorzufinden, TZR_{DPB1*06:01} transfizierte CD4⁺ T-Zellen zeigten jedoch in der IFN- γ ELISpot Analyse eine deutlich größere Reaktivität als TZR_{DPB1*14:01} transfizierte CD4⁺ T-Zellen. Obgleich TZR_{DPB1*06:01} transfizierte CD8⁺ T-Zellen nur in geringen Maßen IFN- γ sezernierten, sollte dieser TZR_{DPB1} weiter analysiert werden (siehe Kapitel 3.3). HLA-DPB1*04:01, das Restriktionselement des TZR_{DPB1*04:01}, ist mit 43,85% das am häufigsten in der kaukasischen Bevölkerung vorkommende HLA-DPB1 Molekül¹⁰⁴. Eine Therapie gegen allo-HLA-DPB1*04:01⁺ Leukämieblasten wäre daher bei einer Großzahl von AML-Patienten anwendbar. Da TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ T-Zellen eine ähnlich hohe Reaktivität wie TZR_{DPB1*06:01}

transfizierte $CD4^+$ T-Zellen aufwiesen und $TZR_{DPB1*04:01}$ transfizierte $CD8^+$ T-Zellen die einzigen Zellen waren, die eine $IFN-\gamma$ Freisetzung aufgrund von Antigenerkennung vermitteln konnten, befasst sich der Hauptteil der folgenden Ergebnisse mit der *in vitro* sowie *in vivo* (siehe Kapitel 3.4) Analyse dieses TZRs.

3.3 Der $CD4$ Korezeptor-abhängige $TZR_{DPB1*06:01}$

Da der $TZR_{DPB1*06:01}$ aus einem $CD4^+$ T-Zell-Klon isoliert wurde, sollte im Folgenden geklärt werden, ob sich die geringe Erkennung $TZR_{DPB1*06:01}$ transfizierter $CD8^+$ T-Zellen (siehe Abb. 3.4) mit der Abhängigkeit dieses TZR von einem $CD4$ Korezeptor erklären lässt. Um Aufschluss über diese $CD4$ Korezeptorabhängigkeit des TZR zu erhalten, wurde die Funktionalität $TZR_{DPB1*06:01}$ transfizierter $CD4^+$ T-Zellen nach Antikörper-vermittelter Blockade (Klon: RPA-T4) des $CD4$ Korezeptor gegen die allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747 getestet. Hierzu wurden die $IFN-\gamma$ Freisetzung (Abb. 3.6a) sowie die lytische Eigenschaft transfizierter sowie Mock transfizierter $CD4^+$ T-Zellen mittels $^{51}Chrom$ -Freisetzungsanalyse (Abb. 3.6b) betrachtet.

$TZR_{DPB1*06:01}$ transfizierte $CD4^+$ T-Zellen sezernierten nicht nur $IFN-\gamma$ als Folge der Erkennung von allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747, sondern waren auch fähig, diese bei einem Effektor zu Zielzellen Verhältnis (E:T) von 60:1 zu 20% zu lysieren. Wurde nun jedoch der $CD4$ Korezeptor der $CD4^+$ T-Zellen blockiert, so sank die $IFN-\gamma$ Freisetzung von 372 auf 88 Spots pro 5×10^3 T-Zellen und die $TZR_{DPB1*06:01}$ transfizierten T-Zellen waren nicht mehr in der Lage, allo-HLA-DPB1*06:01⁺ Zielzellen zu lysieren. Der Einsatz einer Antikörper-Isotypkontrolle zeigte keine Reduktion der Reaktivität.

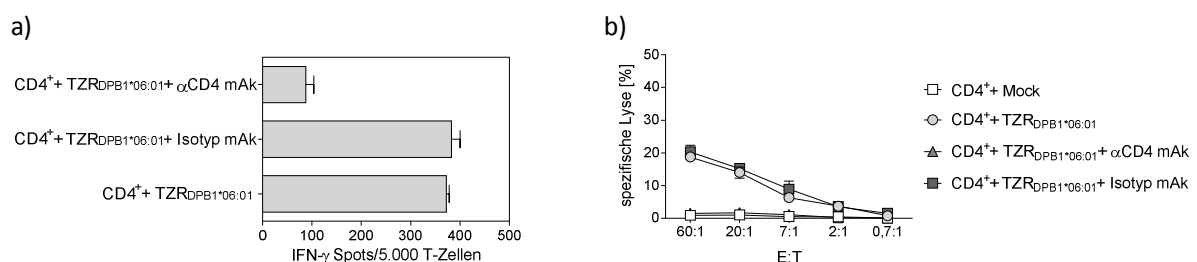


Abb. 3.6.: $CD4$ Korezeptorabhängigkeit des $TZR_{DPB1*06:01}$. $CD4^+$ T-Zellen wurden aus PBMZ gesunder Spender, wie in Abb. 3.2 beschrieben isoliert, stimuliert und Mock oder $TZR_{DPB1*06:01}$ transfiziert. Nach 14 Stunden wurden die transfizierten T-Zellen sowohl in einer 20-Stunden $IFN-\gamma$ ELISpot Analyse, als auch in einer $^{51}Chrom$ -Freisetzungstestung eingesetzt. Hierfür wurden die transfizierten T-Zellen zuvor für eine Stunde mit einem $CD4$ -spezifischen Blockadeantikörper ($\alpha CD4$ mAk, Klon: RPA-T4) mit einer Konzentration von $25 \mu g/ml$ oder mit einer Isotypkontrolle IgG1 κ (Isotyp mAk, Klon: P3.6.2.8.1, $25 \mu g/ml$) als Kontrolle für unspezifische Bindungen des Antikörpers inkubiert. (a) In einer $IFN-\gamma$ ELISpot Analyse wurden 5×10^3 $TZR_{DPB1*06:01}$ transfizierte, vorinkubierte bzw. nicht vorinkubierte $CD4^+$ T-Zellen mit 5×10^4 allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747 in einer Vertiefung einer 96-Loch-ELISpot-Mikrotiterplatte für 20 Stunden inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert eines T-Zell-Spenders (Donor 94) mit je zwei technischen Replikaten \pm SEM. (b) In einer $^{51}Chrom$ -Freisetzungstestung wurden Mock transfizierte (□), $TZR_{DPB1*06:01}$ transfizierte, unbehandelte (○), $TZR_{DPB1*06:01}$ transfizierte, mit $\alpha CD4$ mAk vorinkubierte (▲) sowie mit Isotyp mAk vorinkubierte (■) $CD4^+$ T-Zellen gegen allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747 eingesetzt. Dabei variiert die Anzahl der Effektor Zellen (E) zur Zielzelle ($1,5 \times 10^3$; T, engl.: target) pro

Vertiefung einer 96-Lochplatten in angegebenen Verhältnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier technischer Replikate eines T-Zell-Spenders (Donor 94) \pm SD (Standardabweichung, engl.: *standard deviation*).

Um einen funktionellen Transfer der TZR-Eigenschaften in $CD8^+$ T-Zellen zu ermöglichen, sollte im Folgenden getestet werden, ob sich die Funktionalität des TZR in $CD8^+$ T-Zellen durch die Koexpression des CD4 Korezeptors oder einer Murinisierung der TZR-Sequenzen verbessern lässt.

Zunächst wurde überprüft, ob $TZR_{DPB1*06:01}$ transfizierte $CD8^+$ T-Zellen mit Hilfe eines CD4 Korezeptors die allo-HLA-DPB1*06:01⁺ Zielzelle erkennen und Antigen-spezifisch IFN- γ freisetzen. Hierfür wurden die $CD4^+$ sowie $CD8^+$ Lymphozyten sowohl mit RNA kodierend für den $TZR_{DPB1*06:01}$, als auch im Falle der $CD8^+$ T-Zellen mit RNA kodierend für den CD4 Korezeptor durch Elektroporation transfiziert. Sowohl die Expression des transfizierten $TZR_{DPB1*06:01}$, als auch des CD4 Moleküls wurde durchflusszytometrisch bestätigt (Daten nicht gezeigt). Eine Reduktion der $TZR_{DPB1*06:01}$ Expression in $CD8^+$ T-Zellen durch Transfektion mit der zusätzlichen IVT RNA des CD4 Korezeptors konnte dabei nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die nach Kontrolle der Expression folgende IFN- γ ELISpot Analyse (Abb. 3.7) gegen allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747 Zellen ergab, dass $CD8^+$ T-Zellen ohne zusätzlichen CD4 Korezeptor nur spärlich IFN- γ sezernierten. Nach CD4 Koexpression stieg dagegen die allo-HLA-DPB1*06:01 spezifische Reaktivität der $TZR_{DPB1*06:01}$ transfizierten $CD8^+$ T-Zellen von 83 auf 290 Spots pro $1,5 \times 10^4$ T-Zellen an. Als Kontrolle wurden $TZR_{DPB1*06:01}$ transfizierte $CD4^+$ T-Zellen eingesetzt, welche die höchste IFN- γ Spotanzahl produzierten (526 Spots pro $1,5 \times 10^4$ T-Zellen).

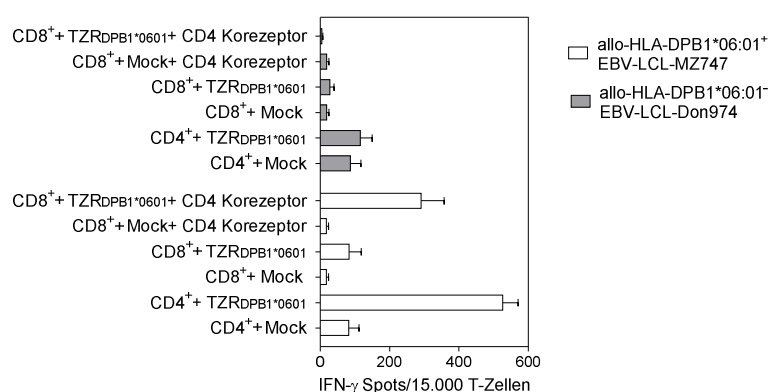


Abb. 3.7.: Analyse der CD4 Korezeptorabhängigkeit des $TZR_{DPB1*06:01}$. Verwendete $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wurden aus PBMZ gesunder Spender, wie in Abb. 3.2 beschrieben isoliert, stimuliert und Mock oder dem $TZR_{DPB1*06:01}$ transfiziert. Zusätzlich dazu wurden in einem weiteren Ansatz $CD8^+$ T-Zellen mit $10 \mu\text{g}$ IVT RNA des CD4 Korezeptors ohne (Mock) sowie mit der IVT RNA des $TZR_{DPB1*06:01}$ durch Elektroporation transfiziert. 14 Stunden nach Elektroporation wurden die Zellen in einem IFN- γ ELISpot eingesetzt. Hierbei wurden $1,5 \times 10^4$ $TZR_{DPB1*06:01}$ transfizierte T-Zellen des jeweiligen Transfektionsansatzes mit 5×10^4 allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747 (□) oder allo-HLA-DPB1*06:01⁻ EBV-LCL-Don974 (■) für 20 Stunden in einer Vertiefung einer 96-Loch-ELISpot-Mikrotiterplatte inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier T-Zell-Spender (Donor 89, 94, 109) mit je zwei technischen Replikaten \pm SEM.

Für TZR aus CD8⁺ T-Zell-Klonen wurde beschrieben, dass eine Korezeptorabhängigkeit durch Steigerung der Avidität, insbesondere durch Optimierung der Antigenbindung, ausgeglichen werden kann^{185,186}. Zur Steigerung der Avidität trägt auch die Verstärkung der Oberflächenexpression eines TZR bei. Daher sollte nun die Steigerung der Avidität durch die Anhebung der TZR-Expression mittels verschiedener, in Kapitel 1.5.1 beschriebener Strategien erfolgen. Hierfür wurde der anfänglich isolierte TZR_{DPB1*06:01} (wild-typ, deshalb für diese Testung als TZR_{DPB1*06:01} wt bezeichnet) entweder in der konstanten Domäne minimalmurinisiert (TZR_{DPB1*06:01} mm; TZR-Cα: P90S, S92V, E91D, S93P; TZR-Cβ: E18K, S22A, F133I, E136A, Q139H) oder eine zusätzliche Disulfidbrücke (TZR_{DPB1*06:01} ds; TZR-Cα: T48C; TZR-Cβ: S57C) zwischen den beiden TZR-Ketten eingebracht^{144,145}. Als dritte Option wurde der TZR_{DPB1*06:01} minimalmurinisiert sowie durch eine weitere Disulfidbrücke verbunden (TZR_{DPB1*06:01} mm+ds) (Abb. 3.8). In einer IFN-γ ELISpot Analyse wurden CD4⁺, CD8⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen mit zusätzlichem CD4 Korezeptor mit den verschieden modifizierten (TZR_{DPB1*06:01} mm, TZR_{DPB1*06:01} ds oder TZR_{DPB1*06:01} mm+ds) TZR_{DPB1*06:01} sowie dem TZR_{DPB1*06:01} wt transfiziert. Dabei vermittelte der TZR_{DPB1*06:01} mm bzw. der TZR_{DPB1*06:01} ds eine Erhöhung der IFN-γ Freisetzung gegenüber der allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747. Ist der TZR_{DPB1*06:01} minimalmurinisiert und exprimiert die zusätzliche Disulfidbrücke, so ist kein additiver Effekt im Vergleich zu den einzelnen Optimierungen zu erkennen (Abb. 3.8). Die Modifikation der TZR_{DPB1*06:01} Gensequenzen führte nicht nur zu einer Steigerung der IFN-γ Freisetzung von TZR_{DPB1*06:01} transfizierten CD4⁺ T-Zellen, sondern auch zu einer IFN-γ Freisetzung von TZR_{DPB1*06:01} transfizierten CD8⁺ T-Zellen (CD8 mit TZR_{DPB1*06:01} mm+ds: 303 Spots pro 1,5x10⁴ T-Zellen). Die Aktivität der CD8⁺ TZR_{DPB1*06:01} mm+ds T-Zellen ist dabei niedriger als die der CD8⁺ Lymphozyten, die zusätzlich zu dem TZR_{DPB1*06:01} wt mit der CD4 Korezeptorkette elektroporiert wurden (Abb. 3.8; CD8 mit TZR_{DPB1*06:01} wt + CD4 Korezeptor: 470 Spots pro 1,5x10⁴ T-Zellen). Durch Einbringung eines CD4 Korezeptors in CD8⁺ T-Zellen mit TZR_{DPB1*06:01} mm+ds ließ sich die Erkennung der allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747 weiterhin steigern (CD8 mit TZR_{DPB1*06:01} mm+ds und CD4 Korezeptor: 629 Spots pro 1,5x10⁴ T-Zellen).

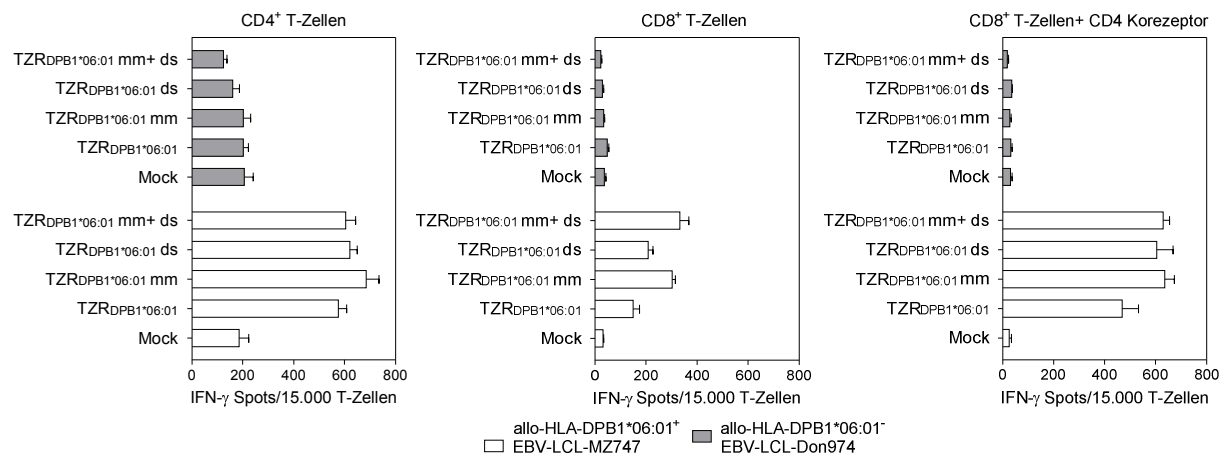


Abb. 3.8.: IFN- γ Freisetzung von TZR_{DPB1*06:01} transfizierten T-Zellen nach TZR-Optimierung. CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen wurden, wie in Abb. 3.2 beschrieben, isoliert und stimuliert. Jeweils 1×10^7 CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen wurden an Tag 7 der Stimulation mittels Elektroporation ohne (Mock) bzw. mit IVT RNA (je $10 \mu\text{g}$ pro TZR-Kette) des allo-HLA-DPB1-reaktiven TZR_{DPB1*04:01} wt, des minimalmurinisierten TZR_{DPB1*06:01} (TZR_{DPB1*06:01} mm), des TZR_{DPB1*06:01} mit zusätzlicher Disulfidbrücke (TZR_{DPB1*06:01} ds) oder des minimalmurinisierten TZR_{DPB1*06:01} mit zusätzlicher Disulfidbrücke (TZR_{DPB1*06:01} mm+ds) ausgestattet. Zusätzlich dazu wurden in einem weiteren Ansatz CD8⁺ T-Zellen mit $10 \mu\text{g}$ IVT RNA des CD4 Korezeptors ohne (Mock) sowie mit der IVT RNA der beschriebenen TZR_{DPB1*06:01} Varianten elektroporiert. Nach 14 Stunden wurde eine IFN- γ ELISpot Analyse durchgeführt. Hierfür wurden $1,5 \times 10^4$ T-Zellen des jeweiligen Transfektionsansatzes mit 5×10^4 allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747 (□) bzw. allo-HLA-DPB1*06:01⁻ EBV-LCL-Don974 (■) für 20 Stunden in einer Vertiefung einer 96-Loch-ELISpot-Mikrotiterplatte inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei T-Zell-Spendern (Donor 89, 94, 109) mit je zwei technischen Replikaten \pm SEM.

Eine Auswirkung der Einbringung eines zusätzlichen CD4 Korezeptors auf die Zytotoxizität der T-Zelle sollte nun auch anhand einer ⁵¹Chrom-Freisetzungsanalyse untersucht werden. Analog der vorausgegangenen IFN- γ ELISpot Analyse fanden hierfür Zielzellen sowie auch Effektorzellen, die Mock oder TZR_{DPB1*06:01} mm+ds transfiziert wurden, Verwendung. Dabei ergab sich, dass TZR_{DPB1*06:01} mm+ds transfizierte CD4⁺, aber insbesondere CD8⁺ T-Zellen mit, aber auch ohne zusätzlicher Transfektion eines CD4 Korezeptors in der Lage sind, allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747 spezifisch zu lysieren (Abb. 3.9). Es zeigte sich, dass die mit dem CD4 Korezeptor und TZR_{DPB1*06:01} mm+ds transfizierten CD8⁺ T-Zellen die stärkste Zytotoxizität aufweisen (54% bei 60:1). Allo-HLA-DPB1*06:01⁻ EBV-LCL-Don974 wurden nicht lysiert. Neben den beiden EBV-LCLs wurden auch primäre AML Blasten des allo-HLA-DPB1*06:01⁺ Patienten MZ747 nach IFN- γ Vorbehandlung (zur Induktion der HLA-DP Expression) als Zielzellen eingesetzt. Sowohl die TZR_{DPB1*06:01} mm+ds transfizierten CD4⁺ als auch die CD8⁺ T-Zellen waren nur in sehr geringem Maße in der Lage, eine

allo-HLA-DPB1 spezifische Zielzell-Lyse der AML Blasten zu vermitteln (CD8⁺ T-Zellen mit TZR_{DPB1*06:01} mm+ds und CD4 Korezeptor: 15% bei 60:1).

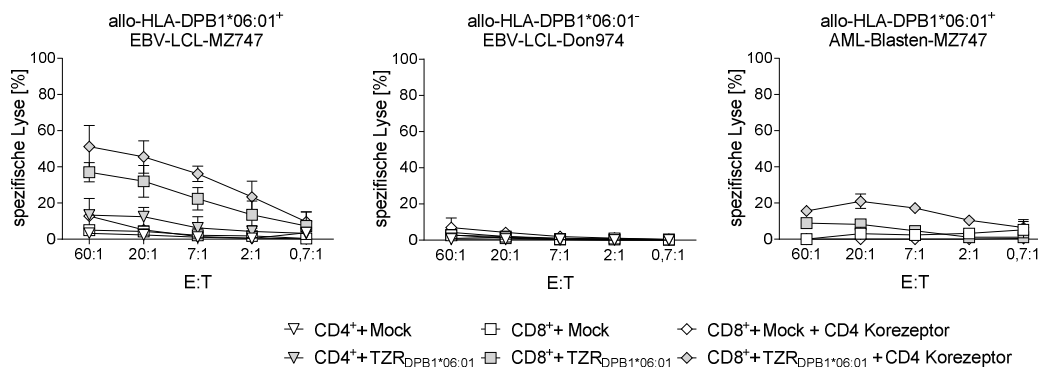


Abb. 3.9.: Zytotoxizität von TZR_{DPB1*06:01} transfizierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest. CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen wurden, wie in Abb. 3.2 beschrieben, isoliert und stimuliert. 1x10⁷ CD4⁺ sowie T-Zellen wurden an Tag 7 der Stimulation mittels Elektroporation ohne (Mock) bzw. mit IVT RNA (je 10µg pro TZR-Kette) des minimalmurinisierten TZR_{DPB1*06:01} mit zusätzlicher Disulfidbrücke transfiziert (TZR_{DPB1*06:01} mm+ds) ausgestattet. Zusätzlich dazu wurden in einem weiteren Ansatz CD8⁺ T-Zellen mit 10µg IVT RNA des CD4 Korezeptors ohne (Mock) sowie mit der IVT RNA der beschriebenen TZR_{DPB1*06:01} Varianten elektroporiert. Nach 14 Stunden wurden die Mock transfizierten (weiße Symbole) sowie TZR_{DPB1*06:01} mm+ds (graue Symbole) transfizierten CD4⁺ (▽/▽), CD8⁺ (□/□) sowie CD8⁺ Lymphozyten mit zusätzlichem CD4 Korezeptor (◇/◇) gegen die allo-HLA-DPB1*06:01⁺ EBV-LCL-MZ747 (n=2, gegen T-Zellen des Donor 109 sowie 115), die allo-HLA-DPB1*06:01⁻ EBV-LCL-Don974 (gegen T-Zellen des Donor 109 sowie 115) und AML-Blasten des allo-HLA-DPB1*06:01⁺ Patienten MZ747 (n=1, gegen T-Zellen des Donor 109) in einem ⁵¹Chrom-Freisetzungstest eingesetzt. Es wurden unterschiedliche in der Abbildung dargestellte E:T Verhältnisse verwendet. Dargestellt ist der Mittelwert verschiedener Experimente mit je zwei technischen Replikaten ± SD.

Da die Steigerung der Oberflächenexpression des TZR_{DPB1*06:01} sich nicht in einer Verbesserung der lytischen Aktivität gegenüber allo-HLA-DPB1*06:01⁺ AML Blasten widerspiegelt und HLA-DPB1*06:01 mit einer Frequenz von ca. 1,83% nur in einem sehr geringen Anteil der kaukasischen Bevölkerung vertreten ist¹⁰⁴, wurden keine *in vivo* Experimente mit diesem TZR durchgeführt.

3.4 Der CD4 Korezeptor-unabhängige TZR_{DPB1*04:01}

Im Gegensatz zu den zuvor getesteten TZR_{DPB1} konnte in den ersten Ergebnissen zur allo-HLA-DPB1*04:01 spezifischen Erkennung gezeigt werden, dass auch TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD8⁺ T-Zellen eine spezifische IFN-γ Freisetzung aufweisen (Abb. 3.4). Dies lässt auf eine CD4 Korezeptorunabhängigkeit schließen, die nun im Folgenden bestätigt werden sollte. Hierfür wurde in einem IFN-γ ELISpot (Abb. 3.10a) und in einer ⁵¹Chrom-Freisetzungsanalyse (Abb. 3.10b) die Bindung des CD4 Korezeptors TZR_{DPB1*04:01} transfizierter T-Zellen an das HLA-Klasse II Molekül der allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 mit einem blockierenden anti-CD4-Antikörper (Klon: RPA-T4) inhibiert. Es zeigte sich, dass sowohl die IFN-γ Freisetzung (Spotreduktion durch αCD4 mAk von 244 auf 203), als auch die spezifische Lyse (spezifische Lyse bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 bei 41% für sowohl αCD4 mAk vorinkubierte, als auch nicht CD4 Korezeptor blockierte

TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ T-Zellen) gegenüber der allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 durch die Blockade nur in sehr geringem Maße beeinträchtigt wurde.

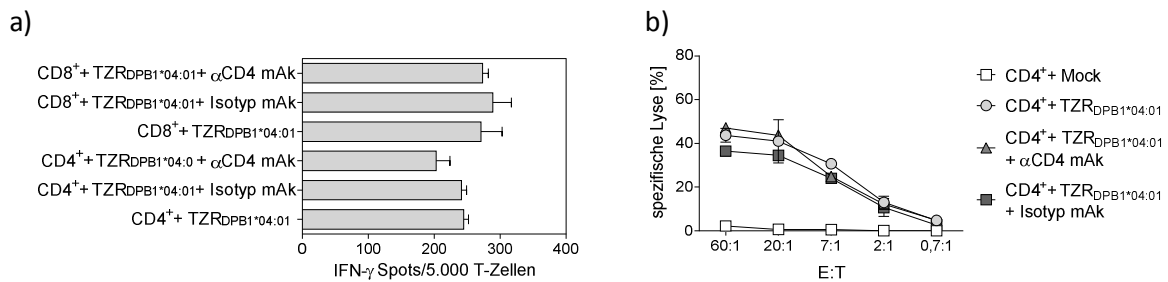


Abb. 3.10.: CD4 Korezeptorabhängigkeit des TZR_{DPB1*04:01}. CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen wurden aus PBMZ gesunder Spender, wie in Abb. 3.2 beschrieben isoliert, stimuliert und Mock oder TZR_{DPB1*04:01} transfiziert. Nach 14 Stunden wurden die transfizierten T-Zellen sowohl in einer 20-Stunden IFN-γ ELISpot Analyse, als auch in einer ⁵¹Chrom-Freisetzungstestung eingesetzt. Hierfür wurden die transfizierten T-Zellen zuvor für eine Stunde mit einem CD4-spezifischen Blockadeantikörper (αCD4 mAk, Klon: RPA-T4) mit einer Konzentration von 25μg/ml oder mit einer Isotypkontrolle IgG1 κ (Isotyp mAk, Klon: P3.6.2.8.1, 25μg/ml) als Kontrolle für unspezifische Bindungen des Antikörpers inkubiert. (a) In einer IFN-γ ELISpot Analyse wurden 5x10³ TZR_{DPB1*04:01} transfizierte, vorinkubierte bzw. nicht vorinkubierte CD4⁺ T-Zellen mit 5x10⁴ allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 in einer Vertiefung einer 96-Loch-ELISpot-Mikrotiterplatte für 20 Stunden inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert eines T-Zell-Spenders (Donor 94) mit je zwei technischen Replikaten ± SEM. (b) In einer ⁵¹Chrom-Freisetzungstestung wurden Mock transfizierte (□), TZR_{DPB1*04:01} transfizierte, unbehandelte (○), TZR_{DPB1*04:01} transfizierte, mit αCD4 mAk vorinkubierte (▲) sowie mit Isotyp mAk vorinkubierte (■) CD4⁺ T-Zellen gegen allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 eingesetzt. Dabei variiert die Anzahl der Effektor Zellen zu Zielzellen pro 96-Lochplatten Vertiefung in angegebenen Verhältnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier technischer Replikate eines T-Zell-Spenders (Donor 94) ± SD.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass der allo-HLA-DPB1*04:01-spezifische TZR_{DPB1*04:01} keinen CD4 Korezeptor zur Antigen-vermittelten T-Zell-Aktivierung benötigt.

Außerdem zeigte sich durch die Analyse der lytischen Aktivität, dass TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ T-Zellen in der Lage sind, allo-HLA-DPB1*04:01 präsentierende EBV-LCLs zu eradizieren. Diese lytische Fähigkeit sollte hierauf folgend auch gegen allo-HLA-DPB1*04:01⁺ AML Blasten untersucht werden. Für diese Analyse wurde jedoch zunächst die Expression des TZR durch Modifikationen verstärkt.

Zur Erhöhung der Oberflächenexpression des allo-HLA-DPB1*04:01-spezifischen TZR wurde die DNA-Sequenz des TZR_{DPB1*04:01} zunächst von der Firma *GeneArt* kodonoptimiert. Dabei wurde die Basenabfolge unter Erhaltung der Aminosäuresequenz an den humanen Zielorganismus angepasst. Dies bedeutet, dass bei der Generierung der DNA-Sequenz nur diejenigen Aminosäurekodons Verwendung finden, die im Menschen am stärksten exprimiert werden, wodurch eine höchstmögliche Translation der mRNA garantiert wird¹⁴³. Vierzehn Stunden nach Elektroporation von CD4⁺ T-Zellen mit verschiedenen modifizierten TZR_{DPB1*04:01} wurde die TZR-Expression durchflusszytometrisch analysiert. Dabei stieg die MFI der Vβ13.2 Expression der mit dem kodonoptimierten TZR_{DPB1*04:01} transfizierten CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu der MFI der mit dem nicht modifizierten TZR_{DPB1*04:01} transfizierten CD4⁺ T-Zellen (TZR_{DPB1*04:01} koop: 63 zu TZR_{DPB1*04:01} wt: 56) an (Abb. 3.11a). Darüber hinaus ließ sich die Vβ13.2 Expression durch die Minimalmurinisierung der konstanten

Domäne des kodonoptimierten TZR_{DPB1*04:01} weiter erhöhen (TZR_{DPB1*04:01} koop+mm: 95). Beim Vergleich der Expression TZR_{DPB1*04:01} koop+mm transfizierter CD4⁺ T-Zellen mit der von CD4⁺ T-Zellen, die mit einem kodonoptimierten TZR_{DPB1*04:01} transfiziert wurden, dessen komplette konstante Domäne gegen eine murine konstante Domäne ausgetauscht wurde (TZR_{DPB1*04:01} koop+chim: 104), ergaben sich nur minimale Unterschiede im Median der Vβ13.2 Expression. Studien zur Stabilität der TZR_{DPB1*04:01} Expression zeigten, dass der kodonoptimierte TZR mit minimalmurinisierte Domäne ohne Antigenkontakt innerhalb der ersten 86 Stunden nach Transfektion von den T-Zellen exprimiert wird (Abb. 3.11b).

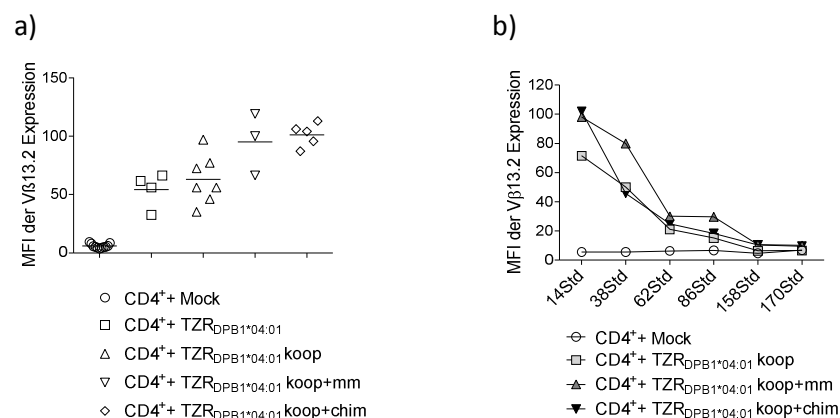


Abb. 3.11.: Analyse der TZR Vβ13.2 Oberflächenexpression auf CD4⁺ T-Zellen. Verwendete CD4⁺ T-Zellen wurden, wie in Abb. 3.2. beschrieben, isoliert und stimuliert. Daraufhin wurden 1x10⁷ CD4⁺ T-Zellen an Tag 7 der Stimulation mittels Elektroporation ohne (Mock) bzw. mit IVT RNA (je 10μg pro TZR-Kette) des allo-HLA-DPB1-reaktiven TZR_{DPB1*04:01} wt, des kodonoptimierten TZR_{DPB1*04:01} (TZR_{DPB1*04:01} koop), des kodonoptimierten, minimalmurinisierten TZR_{DPB1*04:01} (TZR_{DPB1*04:01} koop+mm) oder des chimären, kodonoptimierten TZR_{DPB1*04:01} (TZR_{DPB1*04:01} koop+chim) ausgestattet. (a) 14 Stunden nach Elektroporation wurden CD4⁺ (APC) TZR_{DPB1*04:01} transfizierte T-Zellen auf die TZR_{DPB1*04:01} Oberflächenexpression mittels dem TZR Vβ-Subfamilien-spezifischen, monoklonalen Antikörper Vβ13.2 (PE) analysiert. Dargestellt sind die MFI der Vβ13.2 Expression der Mock transfizierten CD4⁺ T-Zellen von elf gepoolten T-Zell-Spendern (Donor 89, 94, 95, 99, 100, 105, 109, 116, 118, 123, 140; ○), TZR_{DPB1*04:01} wt transfizierten CD4⁺ T-Zellen von vier gepoolten T-Zell-Spendern (Donor 94, 99, 100, 109; □), TZR_{DPB1*04:01} koop transfizierten CD4⁺ T-Zellen von sieben gepoolten T-Zell-Spendern (Donor 89, 95, 105, 109, 116, 118, 123; △) sowie TZR_{DPB1*04:01} koop+mm transfizierten CD4⁺ T-Zellen von drei Spendern (Donor 89, 95, 105; ▽) und TZR_{DPB1*04:01} koop+chim transfizierten CD4⁺ T-Zellen von fünf Spendern (Donor 89, 95, 105, 116, 110; ◇). (b) Die MFI der Vβ13.2 Expression der Transfektion CD4⁺ T-Zellen (APC) mit verschiedenen modifizierten TZR_{DPB1*04:01} wurde 14, 38, 62, 86, 158 sowie 170 Stunden nach Transfektion mittels dem TZR Vβ-Subfamilien-spezifischen, monoklonalen Antikörper Vβ13.2 (PE) gemessen.

Weiterhin ließ sich beobachten, dass auch die IFN-γ Spot Anzahl in einer ELISpot Analyse mit TZR_{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen gegen allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 durch die verschiedenen, zuvor beschriebenen Modifikationen der TZR-Sequenz gesteigert werden konnte (Abb. 3.12). Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl in der Stimulation mit TZR_{DPB1*04:01} transfizierten CD8⁺ T-Zellen (TZR_{DPB1*04:01}: 478 Spots pro 1,5x10⁴ T-Zellen, TZR_{DPB1*04:01}koop+chim: 802 Spots pro 1,5x10⁴ T-Zellen), aber besonders in der Analyse mit CD4⁺ TZR_{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen (TZR_{DPB1*04:01}: 510 Spots pro 1,5x10⁴ T-Zellen, TZR_{DPB1*04:01}koop+chim: 1334 Spots pro 1,5x10⁴ T-Zellen). Die allo-HLA-DPB1*04:01⁻ EBV-LCL-Don595 wurde auch mit Modifikation des TZR_{DPB1*04:01} kaum erkannt.

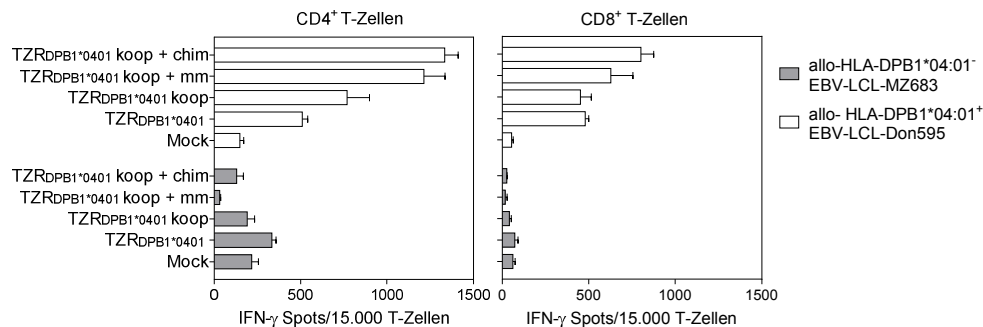


Abb. 3.12.: IFN- γ Freisetzung von TZR_{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen nach TZR-Optimierung. CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen wurden, wie in Abbildung Abb. 3.11 beschrieben, isoliert und stimuliert. 1×10^7 CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen wurden an Tag 7 der Stimulation mittels Elektroporation ohne (Mock) bzw. mit IVT RNA (je $10 \mu\text{g}$ pro TZR-Kette) des allo-HLA-DPB1-reaktiven TZR_{DPB1*04:01} wt, des TZR_{DPB1*04:01} koop, TZR_{DPB1*04:01} koop+mm oder des TZR_{DPB1*04:01} koop+chim ausgestattet. Nach 14 Stunden wurde eine IFN- γ ELISpot Analyse durchgeführt. Hierfür wurden $1,5 \times 10^4$ T-Zellen des jeweiligen Transfektionsansatzes mit 5×10^4 allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 (\square) bzw. allo-HLA-DPB1*06:01⁻ EBV-LCL-Don595 (\blacksquare) für 20 Stunden pro Vertiefung einer 96-Loch-ELISpot-Mikrotiterplatte inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier T-Zell-Spendern (Donor 89, 95, 105, 129) mit je zwei technischen Replikaten \pm SEM.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde der kodonoptimierte TZR_{DPB1*04:01} mit muriner konstanter Domäne für alle weiteren *in vitro* sowie *in vivo* Experimente verwendet. Dieser wird im Folgenden vereinfacht als TZR_{DPB1*04:01} bezeichnet.

3.4.1 Erkennung von primären AML Blasten durch TZR_{DPB1*04:01} RNA transfizierte T-Zellen

Ein wichtiger Aspekt bei der *in vitro* Testung eines TZRs ist die Frage, ob der Rezeptor auch primäre Leukämieblasten von Patienten erkennen und eradizieren kann. Hierfür wurden Leukämiezellen zehn verschiedener AML-Patienten untersucht. Um Aufschluss über die grundlegende HLA-DP Expression der Leukämiezellen der verschiedenen Patienten zu erhalten, wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und der relative MFI der HLA-DP Expression errechnet. Eine repräsentative Darstellung der HLA-DP Expression wurden in Abb. 3.13a für die AML-Blasten der UKR121 gezeigt. Gemittelte Werte sind in Abb. 3.13b, einzelne Daten in Tab. 3.4 dargestellt. Die HLA-DP Expression der Leukämieblasten schwankt stark. So hat die UKR121 einen rMFI von 15,9, während die BB006 mit einen rMFI von 0,69 kaum HLA-DP auf der Oberfläche trägt. Durch eine Inkubation mit IFN- γ ließ sich die HLA-DP Expression noch weiter steigern (Steigerung rMFI_{HLA-DP} von 4,7 auf 8,2)¹⁸⁷. Die Expression der HLA-Klasse I Moleküle werden physiologisch innerhalb eines inflammatorischen Milieus auf der Zelloberfläche herauf reguliert und dienen damit als Kontrolle der IFN- γ Behandlung¹⁸⁸.

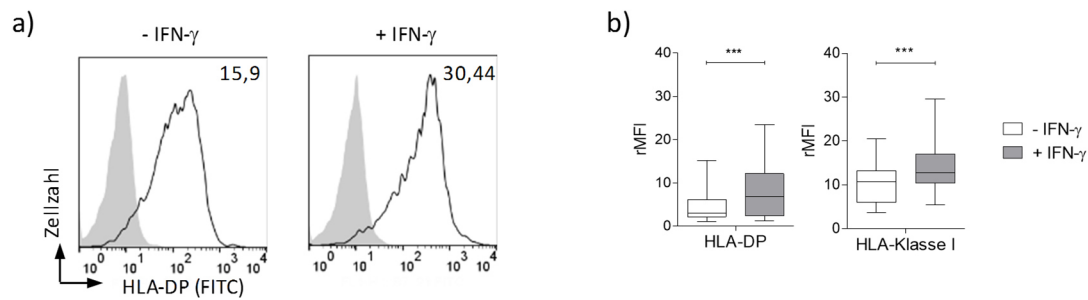


Abb. 3.13.: Analyse der HLA-DP Oberflächenexpression auf AML-Blasten. In einer durchflusszytometrischen Messung wurden die AML-Blasten verschiedener Patienten ohne bzw. nach viertägiger Vorbehandlung mit 500U/ml IFN- γ auf die Expression der HLA-DP Moleküle analysiert. (a) Dargestellt sind die repräsentativen Histogramme der Antigenfärbung (weißes Histogramm) bzw. der Isotopenkontrolle (graues Histogramm) sowie die jeweilige rMFI, berechnet aus Division der ermittelten MFI der Antigenfärbung mit der MFI der Isotopenkontrolle der AML Blasten des Patienten UKR121 mit sowie ohne IFN- γ Vorbehandlung. (b) Analyse der rMFI der HLA-DP und HLA-Klasse I Oberflächenexpression der primären AML Blasten zehn verschiedener AML Patienten. Zur durchflusszytometrischen Messung der Expression der Moleküle wurden die Leukämiezellen unbehandelt (□) oder nach 24 stündiger Vorbehandlung mit 500U/ml IFN- γ (■) verwendet. Daten gezeigt im Boxplot-Diagramm mit dem Median der Verteilung (horizontale Linie), 25% und 75% Quantil sowie Minimal- und Maximalwerte als Whiskers. Statistische Analysen wurde mit Hilfe des *Wilcoxon-signed-rank* Testes durchgeführt, wobei ** für einen $p \leq 0.01$ bzw. *** für $p \leq 0.001$ steht.

Die Analyse der Reaktivität der TZR_{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen erfolgte durch IFN- γ ELISpot Testungen. Hierfür wurden unbehandelte sowie, zur Verbesserung der HLA-DP Expression, 24 Stunden mit IFN- γ vorbehandelte (Kapitel 2.3.4) allo-HLA-DPB1*04:01⁺ und allo-HLA-DPB1*04:01⁻ primäre AML Blasten verwendet. TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ T-Zellen zeigten sich hierbei in der Lage, allo-HLA-DPB1-spezifisch die Leukämiezellen verschiedener Spender mit unterschiedlicher Intensität zu erkennen (Abb. 3.14a). Dabei scheint eine Zytokin-Behandlung der primären Zellen kaum einen Effekt auf die Erkennung zu haben. Auch TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD8⁺ T-Zellen erkannten allo-HLA-DPB1*04:01⁺ Zielzellen, sezernierten jedoch wesentlich weniger IFN- γ als CD4⁺ T-Zellen. Durch die stärkere HLA-DP Expression auf IFN- γ -vorbehandelten Leukämiezellen wurden CD8⁺ T-Zellen meist besser aktiviert. Allo-HLA-DPB1*04:01⁻ Blasten induzierten in beiden T-Zell-Subpopulationen keine T-Zell Aktivierung. Mock transfizierte T-Zellen, die nur ihren endogenen TZR exprimieren, setzten kein IFN- γ im ELISpot gegen Leukämieblasten frei (Daten nicht gezeigt).

Die im ELISpot gewonnenen Ergebnisse bestätigten sich auch im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest. Beispielhaft ist in Abb. 3.14b die spezifische Lyse für den ⁵¹Chrom-Freisetzungstest zwischen TZR_{DPB1*04:01} transfizierten sowie Mock transfizierten CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen und der allo-HLA-DPB1*04:01⁺ AML Blasten des Patienten UKR121 sowie den allo-HLA-DPB1*04:01⁻ AML Blasten des Patienten UKR110 gezeigt. Während die spezifische Lyse aller getesteten AML Blasten verschiedener Patienten sowie die der allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 und der allo-HLA-DPB1*04:01⁻ EBV-LCL-Don595 bei einem E:T Verhältnis von 20:1 in Tab. 3.4 dargestellt ist. Bei der Testung der lytischen Eigenschaften von

TZR_{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen gegenüber allo-HLA-DPB1*04:01⁻ leukämischen Zellen wurden die Blasten weder von TZR_{DPB1*04:01} transfizierten CD4⁺, noch von CD8⁺ T-Zellen eradiziert (Tab. 3.4). Fünf von acht allo-HLA-DPB1*04:01⁺ Blastenpopulationen wurden ohne Zytokin-Vorbehandlung stark lysiert (BB001, BB002, UKR111, UKR121, UK128). Auch hierbei vermittelten CD8⁺ T-Zellen stärkere Zytotoxizität als CD4⁺ Lymphozyten (z.B. UKR111). Zellen, die unter inflammatorischen Bedingungen prä-inkubiert wurden, wurden teilweise auf Grund der erhöhten HLA-DP Expression stärker erkannt und lysiert. Mock transfizierte T-Zellen lysierten keine Blasten, unabhängig davon welches HLA-DPB1 Allel exprimiert wurde (exemplarisch in Abb. 3.14b dargestellt).

Hierbei ist hervorzuheben, dass Blasten mancher Patienten weniger gut von CD4⁺ T-Zellen sowie CD8⁺ T-Zellen erkannt und eradiziert wurden als andere (BB005). Eine Korrelation dieser Beobachtung mit der Stärke der HLA-DP Expression auf den Leukämiezellen konnte durch die generierten Daten nicht gezeigt werden (Tab. 3.4). So lysierten TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ T-Zellen die UKR128 ohne IFN- γ Vorbehandlung (rMFI_{HLA-DP} von 3,56) bei einer E:T von 20:1 zu 26%, während die BB005 bei ähnlicher HLA-DP Expression (rMFI_{HLA-DP} von 3,12) von den gleichen T-Zellen nicht eradiziert wurde.

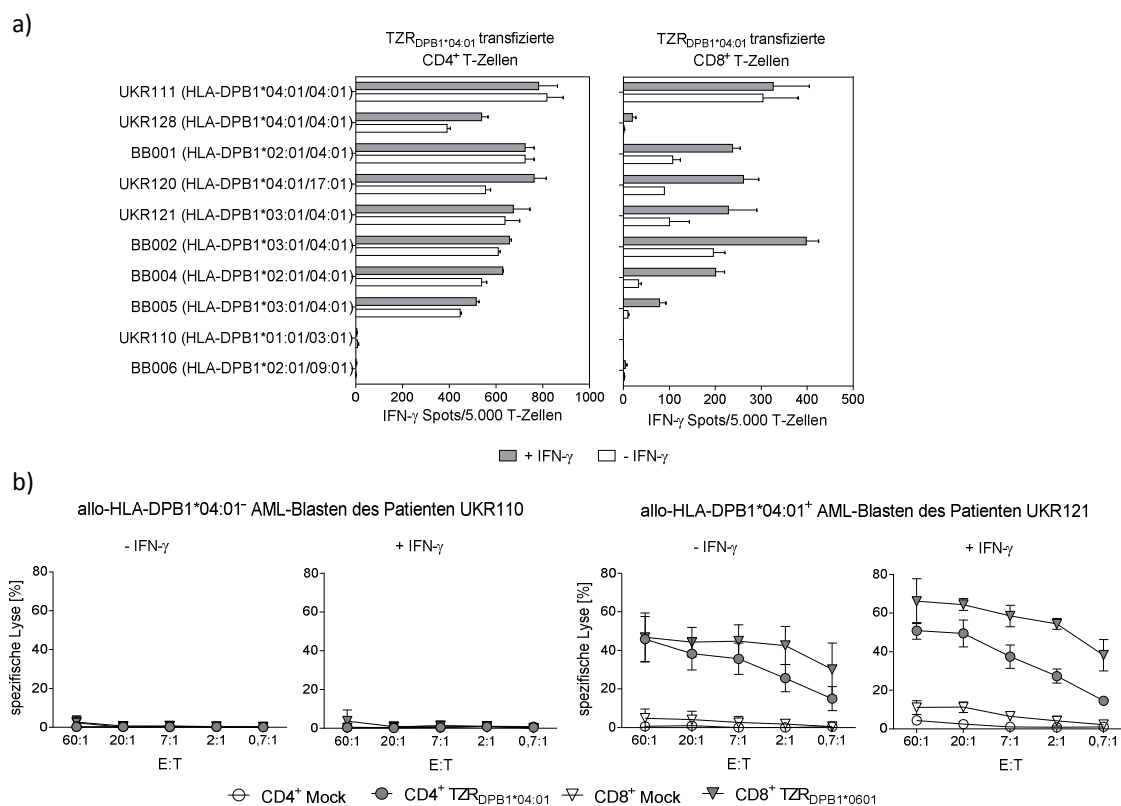


Abb. 3.14.: HLA-DP-spezifische Erkennung von Leukämieblasten. (a) CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen wurden, wie in Abb. 3.2 beschrieben isoliert, stimuliert und mit der TZR_{DPB1*04:01}-RNA transfiziert elektroporiert. In einem IFN- γ ELISpot Assay wurden 5×10^3 mit TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen für 20 Stunden mit 5×10^4 unbehandelten (\square) sowie mit 500U/ml IFN- γ für 24 Stunden vorinkubierten (\blacksquare) AML Blasten stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte der IFN- γ Freisetzung durch die Stimulation von T-Zellen eines T-Zell-Spenders (T-Zellen des Donor 95 verwendet für die Analyse

gegen Blasten der AML Patienten BB001, BB002, BB004, BB005, BB006 und UKR120) oder von drei gepoolten T-Zell-Spendern (T-Zellen der Donoren 89, 165, 166 verwendet für die Analyse gegen Blasten der AML Patienten UKR110, UKR111, UKR121 und UKR128) mit je zwei technischen Replikaten \pm SEM. (b) In einer $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsanalyse wurden die T-Zellen der verschiedenen Transfektionsansätze (Mock \bigcirc bzw. TZR_{DPB1*04:01} \bullet transfizierte CD4⁺ T-Zellen sowie Mock ∇ bzw. TZR_{DPB1*04:01} ∇ transfizierte CD8⁺ T-Zellen) eingesetzt. Als Zielzellen wurden (a) zum einen die Blasten der allo-HLA-DPB1*04:01⁻ AML des Patienten UKR110 (b) zum anderen die Blasten der allo-HLA-DPB1*04:01⁺ AML des Patienten UKR121 eingesetzt. Dabei variiert die Anzahl der Effektor Zellen zu Zielzellen pro 96-Lochplatten Vertiefung in angegebenen Verhältnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifischen Lyse mit je zwei technischen Replikaten \pm SD.

Tab. 3.4.: Spezifische Lyse der TZR_{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen gegenüber AML Blasten verschiedener Spender. CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen wurden, wie in Abb. 3.2 beschrieben isoliert, stimuliert, mit der TZR_{DPB1*04:01}-RNA transfiziert und in der $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsanalyse gegen allo-HLA-DPB1⁺ sowie allo-HLA-DPB1⁻ AML Blasten und EBV-LCLs eingesetzt. Dargestellt sind die Werte der spezifischen Lyse von Leukämiezellen (angegeben in Prozent) aus zwei allo-HLA-DPB1*04:01⁻ sowie acht allo-HLA-DPB1*04:01⁺ Patienten ohne sowie nach 24 stündiger Vorbehandlung mit 500U/ml IFN- γ . Gezeigt ist die spezifische Lyse bei einer E:T Ratio von 20:1. Zusätzlich abgebildet ist die durch durchflusszytometrische Ergebnisse berechnete relative MFI ($\text{rMFI} = \frac{\text{MFI HLA-DP}}{\text{MFI Isotypkontrolle}}$) der HLA-DP Expression der IFN- γ vorbehandelten sowie unbehandelten Blasten. n.t.: nicht getestet.

AML Spender	DPB1*04:01	ohne IFN- γ			mit IFN- γ		
		Zytolytische Aktivität TZR _{DPB1*04:01} transfizierter CD4 ⁺ T-Zellen	Zytolytische Aktivität TZR _{DPB1*04:01} transfizierter CD8 ⁺ T-Zellen	rMFI HLA-DP	Zytolytische Aktivität TZR _{DPB1*04:01} transfizierter CD4 ⁺ T-Zellen	Zytolytische Aktivität TZR _{DPB1*04:01} transfizierter CD8 ⁺ T-Zellen	rMFI HLA-DP
BB006	negativ	0%	0%	0,68	1%	7%	1,05
UKR110	negativ	0%	0%	1,19	0%	1%	2,76
BB001	positiv	20%	20%	2,49	19%	22%	7,3
BB002	positiv	6%	27%	14,62	6%	39%	17,51
BB004	positiv	6%	7%	1,55	11%	25%	4,1
BB005	positiv	0%	0%	3,12	13%	20%	4,05
UKR111	positiv	33%	60%	3,55	32%	56%	7,83
UKR120	positiv	4%	9%	1,62	9%	18%	1,88
UKR121	positiv	38%	44%	15,9	50%	65%	30,44
UKR128	positiv	26%	48%	3,56	30%	52%	5,44
EBV-LCL							
Don595	negativ	2%	6%	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
MZ683	positiv	42%	66%	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

3.4.2 Reaktivität TZR_{DPB1*04:01} RNA transfizierter T-Zellen gegen Gewebezellen

Auf Grund der unter inflammatorischen Bedingungen induzierten HLA-DP Expression auf nicht-hämatopoetischen Zellen stellen HLA-DP spezifische T-Zellen für die adoptive T-Zell-Therapie ein Risiko für die Induktion einer GvHD dar^{80,189}. Um zu untersuchen, ob TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Lage sind, Gewebezellen sowohl unter nicht-inflammatorischen, als auch unter inflammatorischen Bedingungen zu erkennen und zu lysieren, wurden diese T-Zellen auf ihre Funktionalität gegenüber verschiedenen Gewebezellen getestet. Als Gewebezellen wurden hierfür allo-HLA-DPB1*04:01⁺ und allo-HLA-DPB1*04:01⁻ primäre Fibroblasten sowie die allo-HLA-DPB1*04:01⁺ Keratinozyten Zelllinie HaCaT verwendet. Zunächst wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert, ob die verwendeten Fibroblasten HLA-DP auf der Zelloberfläche tragen und inwieweit sich diese durch eine viertägige Inkubation mit IFN- γ erhöhen ließ. Die Ergebnisse bestätigten, dass Fibroblasten unter nicht inflammatorischen Bedingungen minimal HLA-DP exprimieren, diese Expression jedoch durch IFN- γ induziert werden kann (Tab. 3.5, Abb. 3.15a

als repräsentatives Beispiel die HLA-DP Expression der Fibroblasten des Spenders 19, durchschnittliche rMFI der HLA-DP Expression Abb. 3.15b).

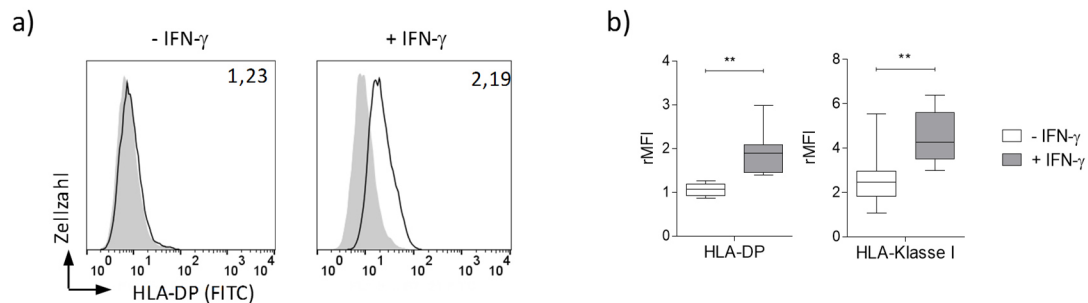


Abb. 3.15.: Analyse der HLA-DP Oberflächenexpression auf Fibroblasten. In einer durchflusszytometrischen Messung wurden die Fibroblasten verschiedener Spender ohne bzw. nach viertägiger Vorbehandlung mit 500U/ml IFN- γ auf die Expression der HLA-DP Moleküle analysiert. (a) Dargestellt sind die repräsentativen Histogramme der Antigenfärbung (weißes Histogramm) bzw. der Isotopenkontrolle (graues Histogramm) sowie die jeweilige rMFI, berechnet aus Division der ermittelten MFI der Antigenfärbung mit der MFI der Isotopenkontrolle der Fibroblasten des Spenders 19 mit sowie ohne IFN- γ Vorbehandlung. (b) Analyse der rMFI der HLA-DP und HLA-Klasse I Oberflächenexpression von Fibroblasten neun verschiedener Spender sowie der Keratinozyten Zelllinie HaCaT. Zur durchflusszytometrischen Messung der Expression der Moleküle wurden die Fibroblasten unbehandelt (□) oder nach 24 stündiger Vorbehandlung mit 500U/ml IFN- γ (■) verwendet. Daten sind gezeigt im Boxplot-Diagramm mit dem Median der Verteilung (horizontale Linie), 25% und 75% Quantil sowie Minimal- und Maximalwerte als *Whiskers*. Statistische Analysen wurde mit Hilfe des *Wilcoxon-signed-rank* Testes durchgeführt, wobei ** für einen $p \leq 0.01$ bzw. *** für $p \leq 0.001$ steht.

Um die funktionellen Eigenschaften der TZR_{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen gegenüber Gewebezellen zu analysieren, wurden ELISpot Analysen sowie ⁵¹Chrom-Freisetzungstestungen durchgeführt. Im IFN- γ ELISpot zeigte sich, dass die allo-HLA-DPB1*04:01⁻ Fibroblasten unabhängig von einer IFN- γ Behandlung weder von TZR_{DPB1*04:01} transfizierten noch von Mock transfizierten CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen erkannt (Abb. 3.16a) und im Zytotoxizitätstest lysiert wurden (Tab. 3.5). Auch die allo-HLA-DPB1*04:01⁺ Fibroblasten sowie die allo-HLA-DPB1*04:01⁺ Keratinozyten Zelllinie HaCaT wurden ohne IFN- γ Behandlung von TZR_{DPB1*04:01} transfizierten bzw. Mock transfizierten CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen nicht erkannt. Wurden jedoch die allo-HLA-DPB1*04:01⁺ Gewebezellen einem inflammatorischen Milieu ausgesetzt, konnten TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen diese nicht-hämatopoetischen Zellen erkennen und lysieren (siehe Tab. 3.5).

Tab. 3.5.: Spezifische Lyse der TZR_{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen gegenüber Gewebezellen. CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen wurden, wie in Abb. 3.2 beschrieben isoliert, stimuliert und mit der TZR_{DPB1*04:01}-RNA transfiziert. Dargestellt sind die Werte der spezifischen Lyse von Fibroblasten (angegeben in Prozent) von drei allo-HLA-DPB1*04:01⁻ und sechs allo-HLA-DPB1*04:01⁺ Spendern sowie der allo-HLA-DPB1*04:01⁺ Keratinozyten Zelllinie HaCaT ohne bzw. nach viertägiger Vorbehandlung mit 500U/ml IFN- γ . Die angegebenen Werte wurden durch eine ⁵¹Chrom-Freisetzungsanalyse ermittelt. Gezeigt ist die Lyse bei einer E:T Ratio von 20:1. Zusätzlich abgebildet ist die gemessene rMFI der HLA-DP Expression der vorbehandelten sowie unbehandelten Fibroblasten. Fb.: Fibroblast.

Spender	DPB1*04:01	ohne IFN- γ			mit IFN- γ		
		Zytolytische Aktivität TZR _{DPB1*04:01} transfizierter CD4 ⁺ T-Zellen	Zytolytische Aktivität TZR _{DPB1*04:01} transfizierter CD8 ⁺ T-Zellen	rMFI HLA-DP	Zytolytische Aktivität TZR _{DPB1*04:01} transfizierter CD4 ⁺ T-Zellen	Zytolytische Aktivität TZR _{DPB1*04:01} transfizierter CD8 ⁺ T-Zellen	rMFI HLA-DP
Fb 11	negativ	2%	1%	0,97	0%	4%	1,98
Fb 15	negativ	0%	0%	1,15	0%	2%	1,47
Fb 17	negativ	0%	1%	1,23	0%	1%	2,19
Fb 13	positiv	0%	2%	1,03	8%	40%	1,4
Fb 19	positiv	0%	1%	0,87	6%	34%	1,7
Fb 22	positiv	1%	1%	1,04	7%	30%	1,89
Fb 29	positiv	0%	2%	1,26	9%	39%	2,06
Fb 53	positiv	0%	7%	1,11	6%	27%	1,9
Fb 58	positiv	1%	1%	0,89	5%	29%	1,4
HaCaT	positiv	0%	1%	1,18	35%	73%	2,99

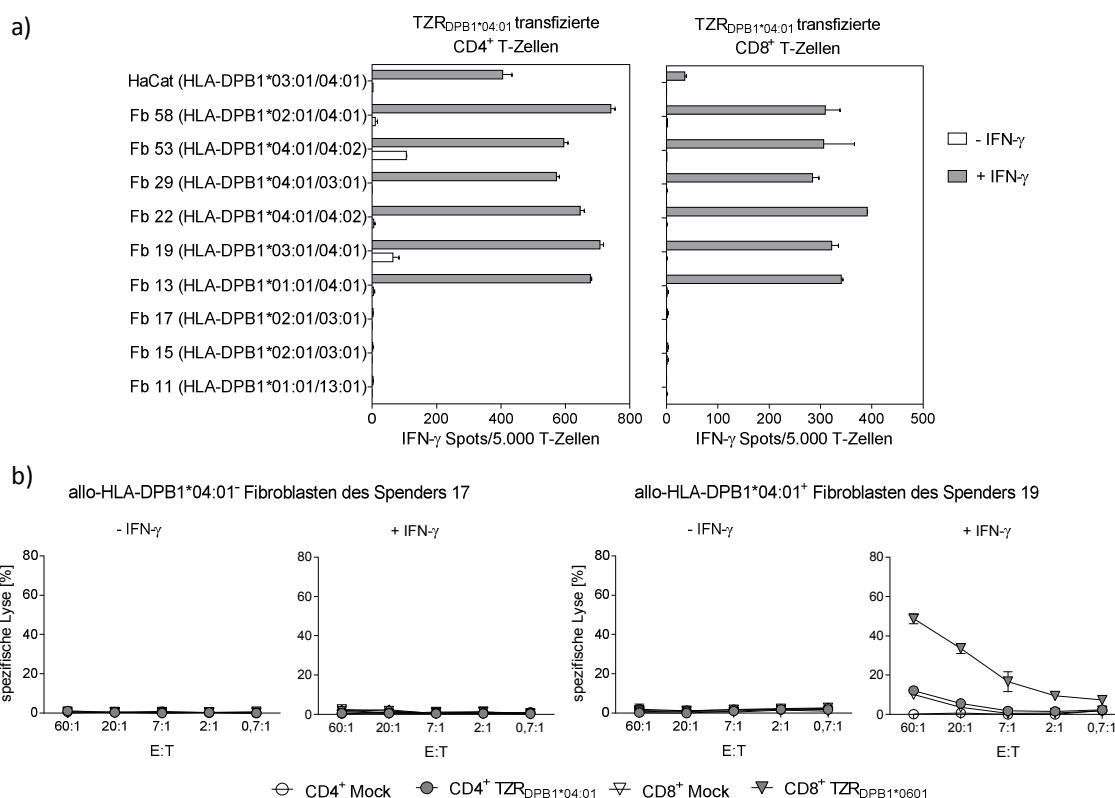


Abb. 3.16.: Spezifische Erkennung von Gewebezellen durch TZR_{DPB1*04:01} transfizierte T-Zellen. CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen wurden, wie in Abb. 3.2 beschrieben isoliert, stimuliert und mit der TZR_{DPB1*04:01}-RNA oder Mock transfiziert. Allo-HLA-DPB1*04:01⁺ bzw. allo-HLA-DPB1*04:01⁻ Fibroblasten sowie die allo-HLA-DPB1*04:01⁺ Keratinozyten Zelllinie HaCaT wurden für vier Tage ohne (□) bzw. mit IFN- γ (500U/ml, ▤) kultiviert. (a) In einem IFN- γ ELISpot Assay wurden 5×10^3 TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen für 20 Stunden mit 3×10^4 allo-HLA-DPB1*04:01⁺ bzw. allo-HLA-DPB1*04:01⁻, nicht (□) sowie mit IFN- γ (▤) vorbehandelten Gewebezellen kultiviert. Gezeigt sind die Mittelwerte der IFN- γ Freisetzung \pm SEM von zwei technischen Replikaten eines T-Zell-Spenders (Donor 89). (b) Des Weiteren wurde mit den T-Zellen der verschiedenen Transfektionsansätze (Mock ○ bzw. TZR_{DPB1*04:01} ● transfizierte CD4⁺ T-Zellen sowie Mock ▽ bzw. TZR_{DPB1*04:01} ▽ transfizierte CD8⁺ T-Zellen) eine ⁵¹Chrom-Freisetzungsanalyse durchgeführt. Als Zielzellen wurden zum einen die Fibroblasten des allo-HLA-DPB1*04:01⁻ Spenders 17 zum anderen die Fibroblasten des allo-HLA-DPB1*04:01⁺ Spenders 19 eingesetzt. Dabei variiert die Anzahl der Effektor Zellen zu Zielzellen pro 96-Lochplatten Vertiefung in angegebenen Verhältnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifischen Lyse eines T-Zell-Spenders (Donor 89) mit zwei technischen Replikaten \pm SD.

Diese Daten zeigen, dass TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unter inflammatorischen Bedingungen in der Lage sind, allo-HLA-DPB1*04:01⁺ Fibroblasten und Keratinozyten spezifisch zu lysieren. Damit sind TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen potentiell in der Lage, eine GvH Reaktion im Patienten auszulösen.

3.4.3 Funktionelle Charakterisierung TZR_{DPB1*04:01} transduzierter T-Zellen *in vivo*

Um die biologische Wirksamkeit des adoptiven Transfers der *in vitro* Leukämie-reaktiven TZR_{DPB1*04:01} exprimierender T-Zellen auch *in vivo* zu analysieren, fand ein AML Xenograftmodell in NSG Mäusen Verwendung (Abb. 2.2)¹⁷⁴. Bei diesem Stamm bildet die Kombination der Mutationen die Grundlage für eine effektive Ansiedlung hämatopoetischer Stammzellen¹⁷⁴ und Leukämieblasten^{175,176}. Studien über den Transfer von humanen Leukämiezellen in NSG Tiere zeigen, dass FLT3-ITD mutierte Blasten eine höhere Wahrscheinlichkeit aufweisen effizienter in Mäuse zu infiltrieren und dort zu proliferieren¹⁷⁶. Daher wurden für die nachfolgend dargestellten *in vivo* Experimente primäre AML Blasten eines FLT3-ITD mutierten Patienten eingesetzt (UKR121, UKR167), deren Anwachsen zuvor in den NSG Tieren innerhalb dieser Arbeit (UKR121) bzw. in der Arbeitsgruppe (UKR167) getestet und bestätigt wurde. Für die folgenden *in vivo* Versuche wurde außerdem ein der klinischen Situation einer minimalen Resterkrankung (engl.: *minimal residual disease*, MRD) angenäherter Versuchsaufbau angestrebt, da zu diesem Zeitpunkt eine Immuntherapie erwiesenermaßen am effektivsten wirkt¹⁹⁰. Hierfür wurde zunächst eine Injektionsdosis primärer Blasten ermittelt, mit der innerhalb von 21 Tagen ein Infiltrationsgrad von 1-5% im murinen Knochenmark erreicht werden konnte. Dies entspricht klinisch einer MRD. Die Injektionsdosis lag bei 1x10⁶ AML Blasten des Patienten UKR121 sowie 5x10⁶ AML Blasten des Patienten UKR167.

Zur ersten Einschätzung der biologischen *in vivo* Funktionalität sollten zunächst retroviral mit dem allo-HLA-DPB1*04:01-spezifischen TZR stabil transduzierte CD4⁺ T-Zellen verwendet werden. Hierfür wurde das Fusionsgen TZR β _{DPB1*04:01}-F2A-TZR α _{DPB1*04:01}, welches eine hohe, äquimolare Expression der beiden Ketten des TZR_{DPB04:01} gewährleistet, generiert und über die Restriktionsschnittstellen XbaI/XhoI in den retroviralen Vektor pMX-IRES-Puro kloniert^{161,191}. Durch das IRES (engl.: *internal ribosomale entry site*)-gekoppelte Resistenzgen dieses Vektors konnten TZR_{DPB1*04:01} transduzierte CD4⁺ T-Zellen mittels einer Selektion durch die Gabe von Puromycin isoliert werden. Nach retroviraler Transduktion und einer Puromycin Selektion (siehe Kapitel 2.4.5) wurden die CD4⁺ T-Zellen für zwei Wochen Antigen-spezifisch mittels

allo-HLA-DP4 (HLA-DPA1*01:03/HLA-DPB1*04:01) RNA transfizierten autologen mDZs expandiert.

Die retroviral transduzierten $CD4^+$ T-Zellen wurden am Tag der Injektion in die Maus auf die Oberflächenexpression des $TZR_{DPB1*04:01}$ überprüft (Abb. 3.17). Analog zur Transfektion mit $TZR_{DPB1*04:01}$ kodierender RNA wird der $TZR_{DPB1*04:01}$ nach retroviraler Transduktion vergleichbar stark exprimiert (Abb. 3.2: Median der $V\beta 13.2$ Expression der Transfektion von $CD4^+$ T-Zellen mit $TZR_{DPB1*04:01}$ kodierender RNA 62; Abb. 3.17a: Median der $V\beta 13.2$ Expression $TZR_{DPB1*04:01}$ retroviral transduzierter $CD4^+$ T-Zellen: 44,5). Außerdem wurden weitere T-Zellen mit einem TZR (TZR_{pp65}) irrelevanter Spezifität ausgestattet, welcher ein Peptid (NLVPMVATV) des CMV Protein pp65 erkennt und zur Subfamilie $V\beta 13.1$ gehört¹³⁵. Diese retroviral transduzierten $CD4^+$ T-Zellen exprimierten den TZR_{pp65} (Ergebnisse einer repräsentativen Transduktion von TZR_{pp65} retroviral transduzierten $CD4^+$ T-Zellen in Abb. 3.17b) in hoher Frequenz. Als Kontrolle der $V\beta 13.2$ sowie $V\beta 13.1$ Expression der endogenen TZR wurden $CD4^+$ T-Zellen, die mit dem retroviralen Überstand mit Leervektor (Mock) transfizierter Phoenix-Zellen transduziert wurden, analysiert (Abb. 3.17a und b).

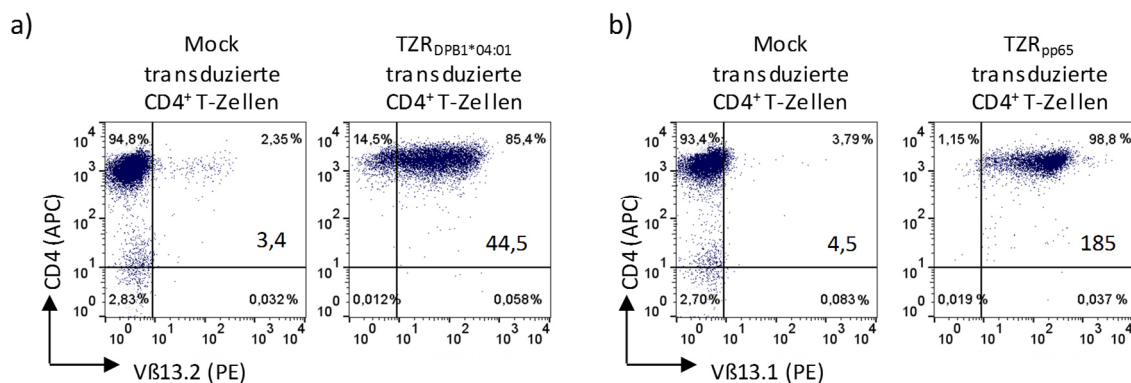


Abb. 3.17.: Expression stabil transduzierter TZR in humanen $CD4^+$ T-Zellen. Verwendete $CD4^+$ T-Zellen wurden aus PBMZs eines gesunden Spenders (Donor 129) mittels magnetischer Zellseparation isoliert, mit 100U/ml IL-2 versetzt und mit 50ng anti-human CD3 Ak für 48 Stunden stimuliert. 4×10^6 $CD4^+$ T-Zellen wurden an Tag 2 und Tag 3 der Stimulation mit dem retroviralen Überstand $TZR_{DPB1*04:01}$, TZR_{pp65} oder mit dem Leervektor (Mock) transfizierter Phoenixzellen transduziert. Nach durchflusszytometrischer Überprüfung der Transduktionseffizienz 48 Stunden nach Transduktion wurden die T-Zellen über drei Tage durch Puromycin selektiert und $TZR_{DPB1*04:01}$ sowie TZR_{pp65} transduzierte $CD4^+$ T-Zellen für zwei Wochen Antigen-spezifisch bzw. mittels Beadstimulation Mock transduzierte $CD4^+$ T-Zellen expandiert. Am Tag der Applikation der T-Zellen in die Maus (vier Tage nach letzter Stimulation) wurde die TZR-Expression durchflusszytometrisch anhand des jeweiligen TZR $V\beta$ -Subfamilien-spezifischen Antikörpers (PE) für (a) $TZR_{DPB1*04:01}$ bzw. (b) TZR_{pp65} transduzierte sowie (a+b) Mock transduzierte $CD4^+$ T-Zellen ($CD4$ -APC) analysiert. Angegeben ist die Prozentzahl der $CD4^+V\beta 13.2^+$ bzw. $CD4^+V\beta 13.1^+$ T-Zellen im rechten, oberen Quadranten und die MFI von $V\beta$ -Expression.

Am Tag der T-Zell-Injektion wurden die $TZR_{DPB1*04:01}$ transduzierten Zellen auch funktionell *in vitro* getestet. Analog zur Testung der RNA-TZR transfizierten T-Lymphozyten geschah dies auch durch IFN- γ -ELISpot Analysen sowie 51 Chrom-Freisetzungstestungen (Abb. 3.18a und c). Dabei erkannten und lysierten die $TZR_{DPB1*04:01}$ stabil transduzierten $CD4^+$ T-Zellen *in vitro* die in die Maus injizierte Patientenleukämie (UKR121). Auch andere allo-HLA-DPB1*04:01⁺

AML-Blasten sowie die allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683 wurden eradiziert, allo-HLA-DPB1*04:01⁻ Zielzellen dagegen nicht (Abb. 3.18c). Die als Kontrollzellen verwendeten TZR_{pp65} transduzierten T-Zellen sezernierten IFN- γ bei Kontakt mit NLV beladenen T2-Zellen, jedoch nicht gegenüber einem irrelevantem Peptid (gp100) (Abb. 3.18b; 483 Spots pro 15.000 Zellen zu 0 Spots).

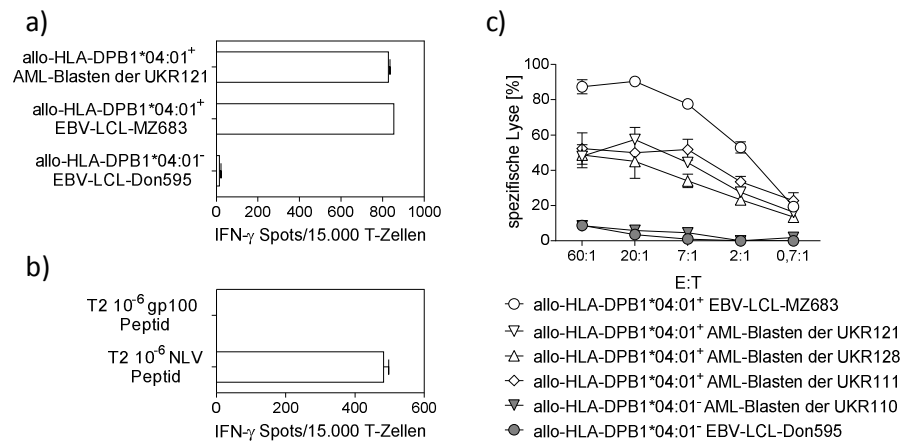


Abb. 3.18.: Funktionelle Charakterisierung TZR transduzierter T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen wurden, wie in Abb. 3.17 beschrieben aus PBMZs des Donor 129 isoliert, durch einen CD3 AK (OKT3) stimuliert, mittels retroviralen Überstand mit TZR_{DPB1*04:01}, TZR_{pp65} bzw. Mock transduziert, selektioniert und Antigen-spezifisch stimuliert. Am Tag der Applikation der T-Zellen in die Maus (vier Tage nach letzter Stimulation) wurde in einer IFN- γ ELISpot Analyse (a) 1.5×10^4 TZR_{DPB1*04:01} transduzierte CD4⁺ T-Zellen mit 5×10^4 allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCL-MZ683, allo-HLA-DPB1*04:01⁻ EBV-LCL-Don595 oder Blasten, der in die Mäuse injizierte allo-HLA-DPB1*04:01⁺ AML (UKR121), inkubiert sowie (b) 1.5×10^4 TZR_{pp65} transduzierte CD4⁺ T-Zellen gegen 5×10^4 NLV bzw. gp100 Peptid beladene T2 stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte der IFN- γ Spots \pm SEM von zwei technischen Replikaten eines T-Zell-Spenders. In c) ist die spezifische Lyse einer ⁵¹Chrom-Freisetzungsanalyse gezeigt. TZR_{DPB1*04:01} transduzierte CD4⁺ T-Zellen wurden mit chromierten allo-HLA-DPB1*04:01⁻ (graue Symbole) und allo-HLA-DPB1*04:01⁺ (weiße Symbole) EBV-LCLs sowie AML-Blasten inkubiert. Es sind die Mittelwerte \pm SD eines Spenders mit je zwei technischen Replikaten abgebildet.

Nach der erfolgreichen *in vitro* Testung der Funktionalität der retroviral transduzierten T-Zellen sollten diese nun im Mausmodell untersucht werden. An Tag 21 nach Transfer der AML-Blasten konnte in Kontrollmäusen ein MRD-Niveau von 5,2% erreicht werden, woraufhin die *in vitro* getesteten TZR_{DPB1*04:01} bzw. TZR_{pp65} retroviral transduzierten CD4⁺ T-Zellen den NSG Tieren appliziert wurden. Eine weitere Kontrollgruppe erhielt anstatt der T-Zellen das gleiche Volumen PBS. Nach sieben weiteren Tagen wurden die Mäuse geopfert. Durch eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen des Knochenmarks sowie der Milz erfolgte die Bestimmung des prozentualen Anteils der CD33⁺/CD45⁺/CD3⁺ Leukämiezellen sowie die Überprüfung der Anwesenheit der injizierten T-Zellen im Knochenmark der Mäuse.

In vivo Analysen mit stabil TZR_{DPB1*04:01} exprimierenden T-Zellen, die 21 Tage nach der Applikation der AML-Blasten des Patienten UKR121 in NSG Tiere injiziert wurden, ergaben, dass die TZR_{DPB1*04:01} transduzierten CD4⁺ T-Zellen nur in geringem Maße innerhalb von sieben Tagen die Blasten der AML UKR121 im murinen Knochenmark eradizieren konnten

(Knochenmarksinfiltration nach Gabe der TZR_{DPB1*04:01} transfizierten CD4⁺ T-Zellen bei 0,88%, bei 1,37% ohne T-Zellen bzw. bei 1,45% durch Gabe TZR_{pp65} transfizierter CD4⁺ T-Zellen; Abb. 3.19a). Nach einer Woche waren nur noch wenige TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark der Mäuse nachweisbar (0,38%; Abb. 3.19b). Auf die Infiltration der Blasten in die Milz hatten die T-Zellen keine Auswirkung (Daten nicht gezeigt).

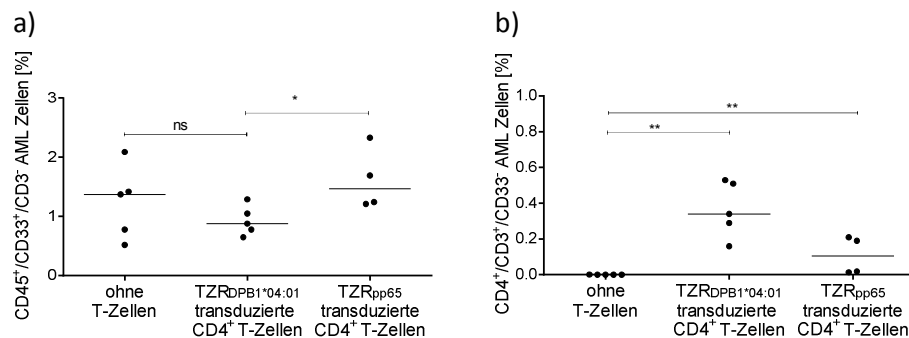


Abb. 3.19.: In vivo Wirksamkeit der TZR_{DPB1*04:01} transduzierten CD4⁺ T-Zellen gegen die AML Blasten des Patienten UKR121. 21 Tage nach der Injektion von 1×10^6 AML Blasten des Patienten UKR121/Maus wurden fünf Tieren keine T-Zellen bzw. fünf Tieren je 1×10^7 TZR_{DPB1*04:01} retroviral transduzierte CD4⁺ T-Zellen und vier Tieren je 1×10^7 TZR_{pp65} retroviral transduzierte CD4⁺ T-Zellen (Donor 129) mit Zytokinen (1000U IL-2, 20 μ g IL-7 pro Maus) injiziert. Nach sieben weiteren Tagen wurde das Knochenmark der Mäuse durchflusszytometrisch auf die Frequenz von (a) CD3⁺/CD33⁺/CD45⁺ Blasten und auf (b) CD3⁺/CD4⁺/CD33⁻ T-Zellen analysiert. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. Die horizontale Linie entspricht dem Median. ns.: nicht signifikant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, nach statistischer Analyse zur Gruppenunterscheidung mittels *Student's t-Test* (ungepaart, zweiseitig) mit Welch's Korrektur nach log-Transformation.

Trotz Abänderung des Versuchsaufbaus, beispielsweise durch die Verwendung CD45RA naiv-angereicherter CD4⁺ T-Zellen bzw. CD8⁺ T-Zellen¹⁹², konnte die Reaktivität der TZR_{DPB1*04:01} transduzierten T-Zellen *in vivo* nicht optimiert werden (Daten nicht gezeigt).

Auf Grund der Tatsache, dass Leukämiezellen verschiedene Immunevasionsstrategien, wie beispielsweise eine Herunterregulation der HLA Moleküle^{193,194}, entwickeln können, sollte im Folgenden überprüft werden, inwiefern die AML-Blasten des Patienten UKR121 über einen solchen Mechanismus verfügen. Hierfür wurde das Expressionslevel dieser und weiterer für die Immunevasion der Leukämie wichtigen Moleküle (CD80, CD86, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3) auf Blasten des Patienten UKR121 durchflusszytometrisch vor (*in vitro*, Abb. 3.20a) und sieben Tage nach Applikation der T-Zellen in die Maus (*ex vivo*, Abb. 3.20b) verglichen. Hierbei fiel besonders auf, dass HLA-DP im Vergleich zu anderen HLA Molekülen stark herunterreguliert wurde (*in vitro*: rMFI_{HLA-DP} 20,5; *ex vivo*: rMFI_{HLA-DP} 1,6). Somit waren die applizierten T-Zellen wahrscheinlich kaum noch in der Lage, die Blasten der UKR121 zu erkennen und zu lysieren. Außerdem wurde sowohl PD-L1 (*in vitro*: rMFI_{PD-L1} 2,8; *ex vivo*: rMFI_{PD-L1} 5,6) als auch PD1 (*in vitro*: rMFI_{PD-L1} 2,7; *ex vivo*: rMFI_{PD-L1} 150) stärker exprimiert.

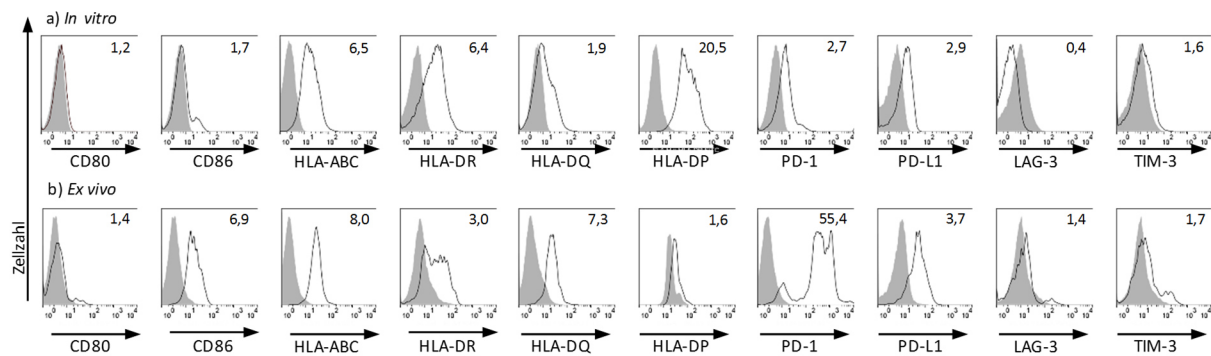


Abb. 3.20.: Oberflächenexpression verschiedener immunregulatorischer Moleküle. In einer durchflusszytometrischen Messung wurden die AML Blasten (a) vor der Injektion in die Maus sowie (b) sieben Tage nach T-Zell-Applikation aus dem Knochenmark einer Maus isoliert und *ex vivo* auf die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle analysiert (siehe Tab. 2.12). Dargestellt sind die Histogramme der Antigenfärbung (graues Histogramm) bzw. der Isotopenkontrolle (weißes Histogramm) sowie die jeweilige rMFI, berechnet aus Division der ermittelten MFI der Antigenfärbung mit der MFI der Isotopenkontrolle.

Zur Unterstützung dieser Theorie fanden nachfolgende *in vivo* Experimente mit den Blasten einer weiteren FLT3-ITD⁺ AML des Patienten UKR167 statt. An Tag 21 nach der Injektion von 5×10^6 Blasten pro NSG Maus wurden analog zu den vorherigen Experimenten naïve-angereicherte CD4⁺ T-Zellen zunächst mit TZR_{DPB1*04:01} transduziert und nach zweiwöchiger Antigen-spezifischer Stimulation den Mäusen intravenös appliziert (1×10^7 /Maus). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse des Knochenmarks sieben Tage nach dem T-Zell-Transfer zeigten eine Eradikation der CD33⁺/CD45⁺/CD3⁻ AML Blasten im Knochenmark der Mäuse. Mäuse, die keine CD4⁺ T-Zellen oder CD4⁺ T-Zellen mit irrelevanten TZR (TZR_{pp65}) erhalten hatten, waren zu ca. 3% von humanen Leukämiezellen infiltriert (Abb. 3.21). Damit konnte gezeigt werden, dass TZR_{DPB1*04:01} exprimierende T-Zellen in der Lage sind, die Leukämie allo-HLA-DPB1 spezifisch auch *in vivo* signifikant zu bekämpfen.

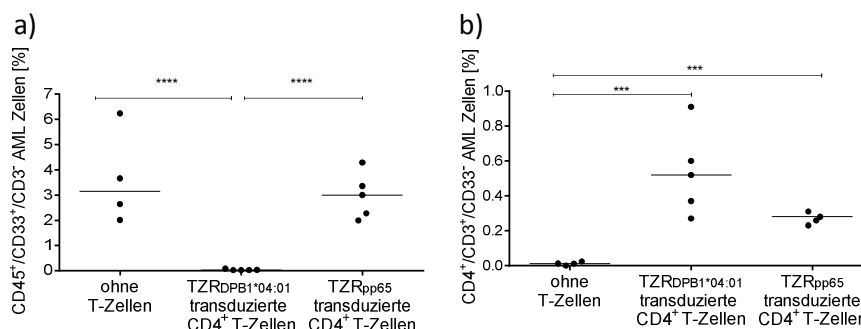


Abb. 3.21.: *In vivo* Wirksamkeit der TZR_{DPB1*04:01} transduzierten T-Zellen gegen die AML Blasten des Patienten UKR167. 21 Tage nach der Injektion von 5×10^6 AML Blasten des Patienten UKR167/Maus wurden vier Tieren keine T-Zellen, fünf Tieren 1×10^7 TZR_{DPB1*04:01} retroviral transduzierte CD4⁺ T-Zellen sowie fünf Tieren 1×10^7 TZR_{pp65} retroviral transduzierte CD4⁺ T-Zellen (Donor 140) mit Zytokinen (1000U IL-2, 20 μ g IL-7 pro Maus) injiziert. Nach sieben weiteren Tagen wurde das Knochenmark der Mäuse durchflusszytometrisch auf die Frequenz von (a) CD33⁺/CD45⁺/CD3⁻ Blasten und auf (b) CD3⁺/CD4⁺/CD3⁻ T-Zellen analysiert. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. Die horizontale Linie entspricht dem Median. ns.: nicht signifikant, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, nach statistischer Analyse zur Gruppenunterscheidung mittels Student's t-Test (ungepaart, zweiseitig) mit Welch's Korrektur nach log-Transformation. Daten stammen aus einer einzelnen Testung.

3.5 Generierung allo-HLA-DPB1-spezifischer CD4 Korezeptor-unabhängiger T-Zell-Populationen

Der T-Zell-Klon 11C12, aus dem der in Kapitel 3.4 beschriebene allo-HLA-DPB1*04:01-spezifische TZR_{DPB1*04:01} isoliert wurde, war der einzige unter den getesteten T-Zell-Klonen, dessen TZR CD4 Korezeptor-unabhängig zur Aktivierung der T-Zelle führte. Diese Eigenschaft ist aber, wie durch die anderen beiden TZR gezeigt, für die Übertragung der TZR vermittelten HLA-Spezifität auf CD8⁺ T-Zellen wichtig.

Um weitere Leukämie-reaktive, allo-HLA-DPB1-spezifische Klone mit der seltenen Eigenschaft der CD4 Korezeptorunabhängigkeit zu generieren, wurde ein Protokoll zur Isolation solcher T-Zell-Populationen etabliert (Abb. 3.22). Diese Methode basiert weitestgehend auf dem Versuchsaufbau, welcher zur Generierung der T-Zell-Klone 2C4, 1F3 sowie 11C12 geführt hat^{180,181}. Für diesen Ansatz wurden zunächst CD4⁺ T-Zellen mittels MACS[®] Technologie isoliert und in einem weiteren Schritt aus diesen phänotypisch naive (CD45RA⁺) mittels FACS Sortierung angereichert. Diese naïv-angereicherten CD4⁺ T-Zellen (1x10³) wurden in einer 96-Lochplatte ausgesät. Um nun eine CD4-unabhängige Stimulation der T-Zellen zu erreichen, wurden die T-Zellen für eine Stunde mit einem CD4 blockierenden Antikörper (0,1µg per Well, Klon RPA-T4) inkubiert. Nach dieser Blockade wurden die T-Zellen in einem Effektor zu Zielzell Verhältnis von 20:1 mit Zytokin-ausgereiften, autologen, mit allogenen HLA-DP RNA-transfizierten und mit 70Gy bestrahlten dendritischen Zellen kokultiviert. Außerdem wurde zur Gewährleistung guter Wachstumsbedingungen der Kultur zusätzlich IL-7, -15 und -12 zugegeben. Die so entstandenen T-Zell-Populationen wurden wöchentlich mit autologen, allo-HLA-DP exprimierenden mDZs (20:1) stimuliert. Ab Tag 14 wurde IL-12 durch IL-2 ersetzt. Bis einschließlich der dritten Stimulation (Tag 21) erfolgte vor Zugabe der autologen mDZs eine einstündige Vorbehandlung der T-Zellen mit dem CD4 blockierenden Antikörper (1µg/ml). Die Untersuchung der T-Zell-Spezifität, Reaktivität und CD4 Rezeptor-Abhängigkeit erfolgte in der Regel an Tag 5 der vorausgegangenen Restimulation mittels IFN-γ ELISpot und ⁵¹Chrom-Freisetzungstests, erstmalig an Tag 14+5 nach primärer Stimulation. Im Weiteren wurden ausgewählte CD4⁺ T-Zell-Populationen hinsichtlich ihres TZR-Repertoires analysiert.

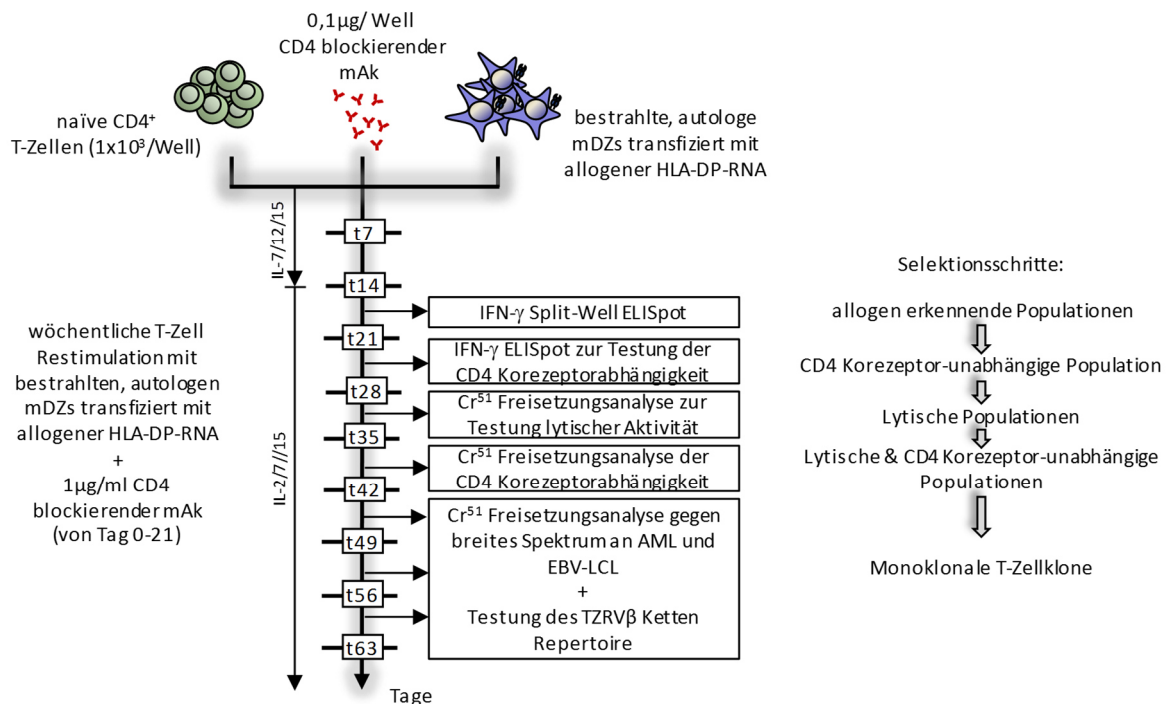


Abb. 3.22.: Schema der Generierung von allo-HLA-DPB1-spezifischen, CD4 Korezeptor-unabhängigen, CD4⁺ T-Zell-Klonen. CD4⁺CD45RA⁺ naiv angereicherte Spender T-Zellen (1x10³ Zellen/Vertiefung) wurden im 96-Lochplatten Format mit autologen und mit 70Gy bestrahlten mDZs (5x10¹ Zellen/Vertiefung), welche mit der α- und β-Kette eines allogenen HLA-DP Allels RNA-transfiziert wurden, kokultiviert. Pro Vertiefung wurden die T-Zellen mit 0,1 µg eines blockierenden αCD4 Antikörpers (RPA-T4) vor der primären Stimulation bis einschließlich Tag 21 mit 1 µg/ml vor der wöchentlichen Restimulation mit den autologen mDZs (1:20) für eine Stunde inkubiert. Zu jeder Stimulation wurden die Zytokine IL-7 (5ng/ml), -12 (1ng/ml) und -15 (5ng/ml) zugegeben. Ab Tag 14 der Stimulation wurde IL-12 durch IL-2 (50-100U/ml) ersetzt. An Tag 5 nach der wöchentlichen Restimulation erfolgten funktionelle Analysen. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der T-Zell-Population wurden die T-Zellen an Tag 14+5 auf Allo-/Autoreaktivität getestet, an Tag 21+5 auf ihre CD4 Korezeptorabhängigkeit und an Tag 28+5 hinsichtlich ihrer lytischen Reaktivität. Die CD4 Korezeptorabhängigkeit im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest und letztendlich die Testung des TZR Vβ-Ketten Repertoires erfolgte an Tag 35+5, 42+5, 49+5 bzw. 56+5. mDZs.: gereifte dendritische Zellen, t.: Tage, ⁵¹Cr.: Chrom 51.

3.5.1 Spezifität von HLA-DP-spezifischen CD4 T-Zell-Populationen

In den oben beschriebenen Stimulationskulturen konnten aus unterschiedlichen T-Zell-Spendern (Donor 129, 140, 166, 167, 199) zahlreiche CD4⁺ T-Zell-Populationen mit spezifischer Reaktivität gegenüber allo-HLA-DPB1*02:01 (für Donor 166, 167), allo-HLA-DPB1*03:01 (für Donor 129, 167) oder allo-HLA-DPB1*04:01 (für Donor 199, 166, 140, 129) generiert werden.

An Tag 5 nach der zweiten Restimulation, also an Tag 19 der Kultur, wurden *Split-Well* ELISpot Analysen durchgeführt. Dadurch wurden T-Zell-Populationen identifiziert, die autologe mDZs erkennen und deshalb von der weiteren Kultivierung ausgeschlossen wurden (Abb. 3.23a). Populationen, die nur das allogene HLA-DP erkennen, wurden weiter kultiviert. Die so entstandenen T-Zell-Populationen zeigten ausschließlich eine HLA-DP-vermittelte Reaktivität. Dies bewiesen repräsentative Daten der allo-HLA-DPB1*03:01 restringierten T-Zell-Populationen 11E2 und 11G1 der Stimulation des Donor 167 mit allo-HLA-DPB1*03:01 exprimierenden mDZs. Diese zeigten im ELISpot einzig eine

HLA-DP-spezifische Reaktivität, da die Erkennung der Antigen-präsentierenden Zellen durch eine Antikörper-vermittelte Blockade der TZR:HLA-DP Bindung inhibiert werden konnte (Reduktion der Spotanzahl bei Stimulation der allo-HLA-DPB1*03:01-spezifischen T-Zell-Population 11E2 mit autologen allo-HLA-DPB1*03:01 transfizierten mDZs nach Blockade des HLA-DP Moleküls von 225 auf 20; Abb. 3.23b). Die Blockade der HLA-Klasse I sowie HLA-DR und -DQ Oberflächenmoleküle löste keine Reduktion der IFN- γ Freisetzung aus.

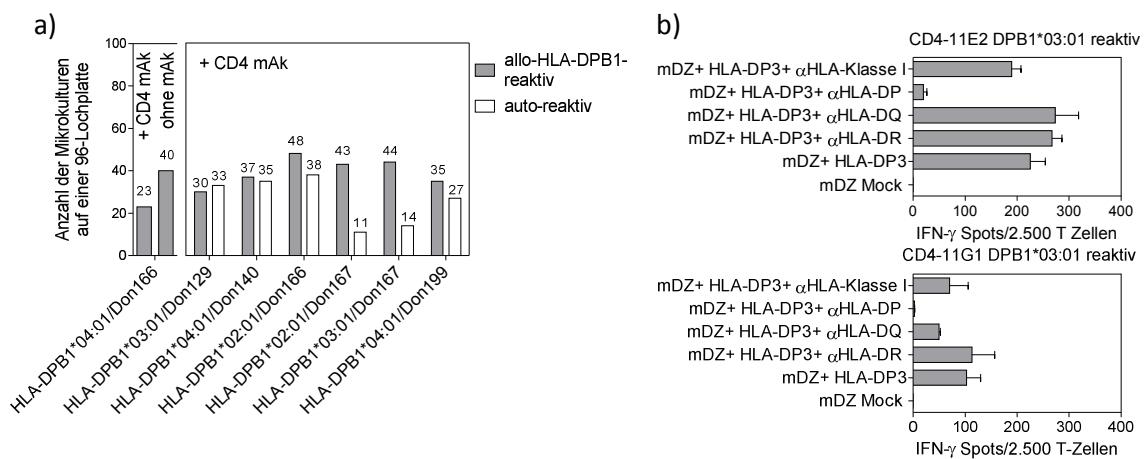


Abb. 3.23.: Erkennung allo-HLA-DPB1 auf autologen mDZs durch generierte T-Zell-Populationen. (a) T-Zell-Populationen wurden durch die Stimulation mit autologen, allo-HLA-DP exprimierenden mDZs unter CD4 Korezeptor-blockierenden Bedingungen sowie in einer einzelnen Testung ohne CD4 Blockade (allo-HLA-DPB1*04:01/Don166) generiert. In einer IFN- γ ELISpot Analyse wurden $2,5 \times 10^3$ T-Zellen auf ihre allo-HLA-DP bzw. Autoreaktivität gegen $1,5 \times 10^4$ autologe bzw. autologe, allo-HLA-DPB1*03:01 exprimierende mDZs untersucht. Dargestellt ist die Anzahl der Population die unter CD4 Korezeptor-blockierenden Bedingungen sowie ohne Blockade generiert wurden und Allo-HLA-DP- (graue Balken) bzw. Autoreaktivität (weißer Balken) aufwies. (b) Allo-HLA-DPB1*03:01-spezifische T-Zell Populationen 11E2 und 11G1 wurden durch die Kokultur von naiven CD4⁺ T-Zellen eines gesunden allo-HLA-DPB1*03:01⁻ Spenders (Don167) mit autologen, allo-HLA-DP3 (HLA-DPB1*03:01/DPA1*01:03) exprimierenden mDZs unter CD4 Korezeptor-blockierenden Bedingungen isoliert. In einem IFN- γ ELISpot wurde die spezifische Erkennung von CD4⁺ T-Zell Populationen 11E2 und 11G1 ($2,5 \times 10^3$ /Lochplattenvertiefung einer ELISpot Mikrotiterplatte) gegen $1,5 \times 10^4$ autologe, allo-HLA-DPB1*03:01 exprimierende mDZs getestet. Die HLA-DP Spezifität der TZR-HLA Interaktion wurde durch Verwendung monoklonaler, blockierender Antikörper für HLA-Klasse I (Klon: W6/32) sowie HLA-DR (Klon: HB55), -DQ (Klon: SPV-L3) und -DP (Klon: B7/21) (Tab. 2.15) analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte der IFN- γ Freisetzung \pm SEM von zwei technischen Replikaten je einer T-Zell Population.

3.5.2 Funktionalität allo-HLA-DPB1-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Populationen

Zur Testung der allo-HLA-DPB1-spezifischen Reaktivität der T-Zell-Populationen *in vitro* wurden IFN- γ ELISpot Analysen und ⁵¹Chrom-Freisetzungstestungen durchgeführt. Als Zielzellen wurden allo-HLA-DPB1⁺ oder allo-HLA-DPB1⁻ EBV-LCLs sowie allo-HLA-DPB1⁺ oder allo-HLA-DPB1⁻, mit IFN- γ vorbehandelte, primäre AML Zellen verwendet. Die folgenden Ergebnisse zeigen Daten zweier allo-HLA-DPB1*03:01 restringierter T-Zell-Populationen (11E2 und 11G1) (Abb. 3.24) und sind repräsentativ für nicht gezeigte Ergebnisse weiterer T-Zell-Populationen dieses Stimulationsprotokolls (Tab. 3.6).

Es zeigte sich, dass die T-Zell-Populationen 11E2 und 11G1 spezifisch allo-HLA-DPB1*03:01⁺ EBV-LCLs sowie allo-HLA-DPB1*03:01⁺ AML im IFN- γ ELISpot erkennen und lysieren, während durch Stimulation mit allo-HLA-DPB1*03:01⁻ EBV-LCLs sowie allo-HLA-DPB1*03:01⁻ primären Leukämieblasten kein IFN- γ freigesetzt und keine Zytotoxizität vermittelt wird. Hierbei ist, wie schon bei der Testung des TZR_{DPB1*04:01} auffällig, dass Blasten mancher AML Patienten schlechter erkannt werden, unabhängig davon wie stark die HLA-DP Expression der AML-Zellen ist (Daten nicht gezeigt).

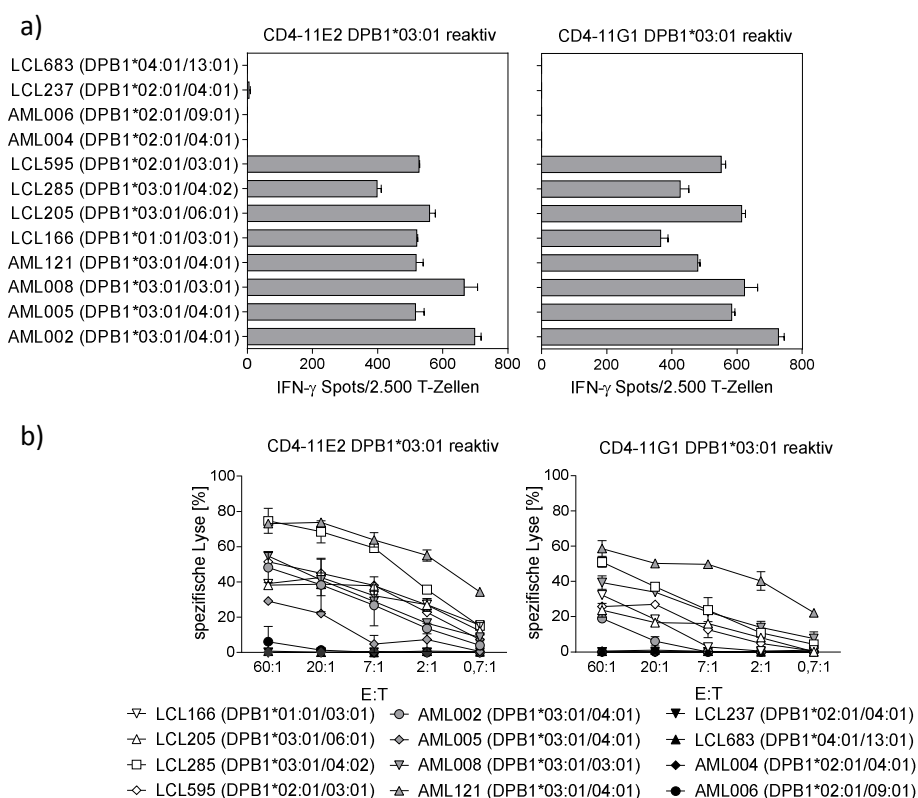


Abb. 3.24.: CD4⁺ T-Zell-Populationen 11E2 und 11G1 vermitteln allo-HLA-DPB1-spezifische Erkennung und Lyse von AML Blasten und EBV-LCLs. (a) In einem IFN- γ ELISpot wurde die allo-HLA-DPB1-spezifische Erkennung der allo-HLA-DPB1*03:01 reaktiven CD4⁺ T-Zell-Populationen 11E2 (linker Graph) gegenüber allo-HLA-DPB1*03:01⁺ Leukämiezellen bzw. EBV-LCLs (5x10⁴/Lochplattenvertiefung einer ELISpot Mikrotiterplatte) untersucht. Es sind die Mittelwerte \pm SEM mit je zwei technischen Replikaten abgebildet. (b) Die zytolytische Aktivität der allo-HLA-DPB1*03:01-reaktiven T-Zell-Populationen 11E2 (linker Graph) und 11G1 (rechter Graph) gegenüber allo-HLA-DPB1*03:01⁺ EBV-LCLs (weiße Symbole), allo-HLA-DPB1*03:01⁺ AML Blasten (graue Symbole) und allo-HLA-DPB1*03:01⁻ EBV-LCLs oder AML Blasten (schwarze Symbole) verschiedener Spender bzw. Patienten wurden in einer ⁵¹Chrom-Freisetungsanalyse getestet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD mit je zwei technischen Replikaten.

3.5.3 CD4 Korezeptorunabhängigkeit von allo-HLA-DPB1-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Populationen

Zur Analyse der CD4 Korezeptorabhängigkeit der CD4 T-Zell-Reaktivität erfolgte die Testung der verschiedenen T-Zell-Populationen zunächst in einem IFN- γ ELISpot gegen allo-HLA-DP exprimierende, autologe mDZs. Dabei wurde mittels Antikörperblockade die Interaktion mit dem CD4 Korezeptor inhibiert. Unter diesen Bedingungen sollten nur

CD4 Korezeptor-unabhängige T-Zell-Populationen das Zielmolekül erkennen und daraufhin IFN- γ freisetzen (Abb. 3.25). Populationen, deren IFN- γ Freisetzung sich durch den Blockadeantikörper inhibieren ließen, wurden nicht weiter getestet (Abb. 3.25b).

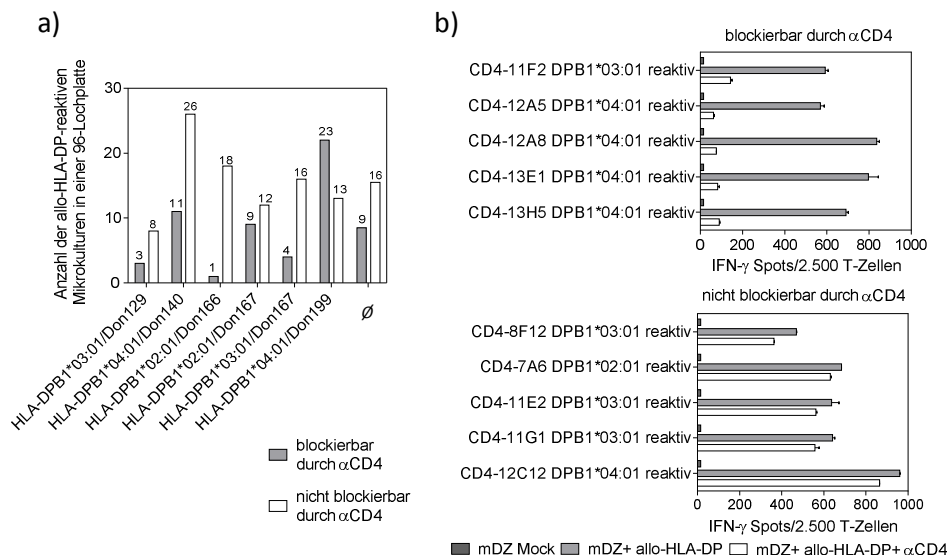


Abb. 3.25.: CD4 Korezeptorunabhängigkeit von allo-HLA-DPB1-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Populationen. (a) Allo-HLA-DPB1-spezifische T-Zell-Populationen ($2,5 \times 10^3$ /Lochplattenvertiefung einer ELISpot Mikrotiterplatte) verschiedener Spender wurden in einer IFN- γ ELISpot Analyse gegen autologe, allo-HLA-DPB1 exprimierende mDZs ($1,5 \times 10^4$ /Lochplattenvertiefung einer ELISpot Mikrotiterplatte) auf ihre CD4 Korezeptorabhängigkeit unter Verwendung eines CD4-blockierenden Antikörpers (RPA-T4; $2,5 \mu\text{g}$ /Lochplattenvertiefung) untersucht. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte zweier technischer Replikate \pm SEM. (b) Von verschiedenen Spendern und Stimulationen stammende CD4⁺ T-Zell-Populationen ($2,5 \times 10^3$ /Lochplattenvertiefung einer ELISpot Mikrotiterplatte) mit daraus resultierender verschiedener allo-HLA-DPB1 Allel Erkennung (7A6 der Mikrokultur allo-HLA-DPB1*02:01/Don166, 8F12 der Mikrokultur allo-HLA-DPB1*03:01/Don129, 11E2, 11F2 und 11G1 der Mikrokultur allo-HLA-DPB1*03:01/Don167, 12A5, 12A8 und 12C12 der Mikrokultur allo-HLA-DPB1*04:01/Don140, 13E1 und 13H5 der Mikrokultur allo-HLA-DPB1*04:01/Don199) wurden im ELISpot gegen $1,5 \times 10^4$ autologe, allo-HLA-DPB1 exprimierende mDZs stimuliert. Durch die Gabe eines CD4-spezifischen Antikörpers (RPA-T4; $2,5 \mu\text{g}$ /Well) soll die Bindung des CD4 Korezeptors an das HLA-DP Molekül blockiert werden. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte zweier technischer Replikate \pm SEM.

Diese gegen allo-HLA-DPB1 exprimierende mDZs wirkende CD4 Korezeptorabhängigkeit zeigte sich auch in der IFN- γ ELISpot Analyse und der Zytotoxizitätstestung der repräsentativen T-Zell-Population 11E2 bzw. 11G1 (Abb. 3.26) gegen allo-HLA-DPB1*03:01⁺ AML Blasten sowie allo-HLA-DPB1*03:01⁺ EBV-LCLs. Auffällig war jedoch, dass die T-Zell-Population 11E2 in der ⁵¹Chrom-Freisetzungstestung gegenüber allo-HLA-DPB1*03:01⁺EBV-LCLs ein schwächeres Lyseverhalten mit CD4 Korezeptor blockierenden Antikörper (34% spezifische Lyse bei einer E:T von 60:1) im Vergleich zum Ansatz ohne CD4 Blockade vermittelt (74% spezifische Lyse bei einer E:T von 60:1; Abb. 3.26b). Bei der Testung der 11E2-Population gegen allo-HLA-DPB1*03:01⁺ Leukämiezellen ließ sich diese Inhibition nicht beobachten (ca. 55 % spezifische Lyse bei einer E:T von 60:1 mit sowie ohne CD4 Blockade; Abb. 3.26b).

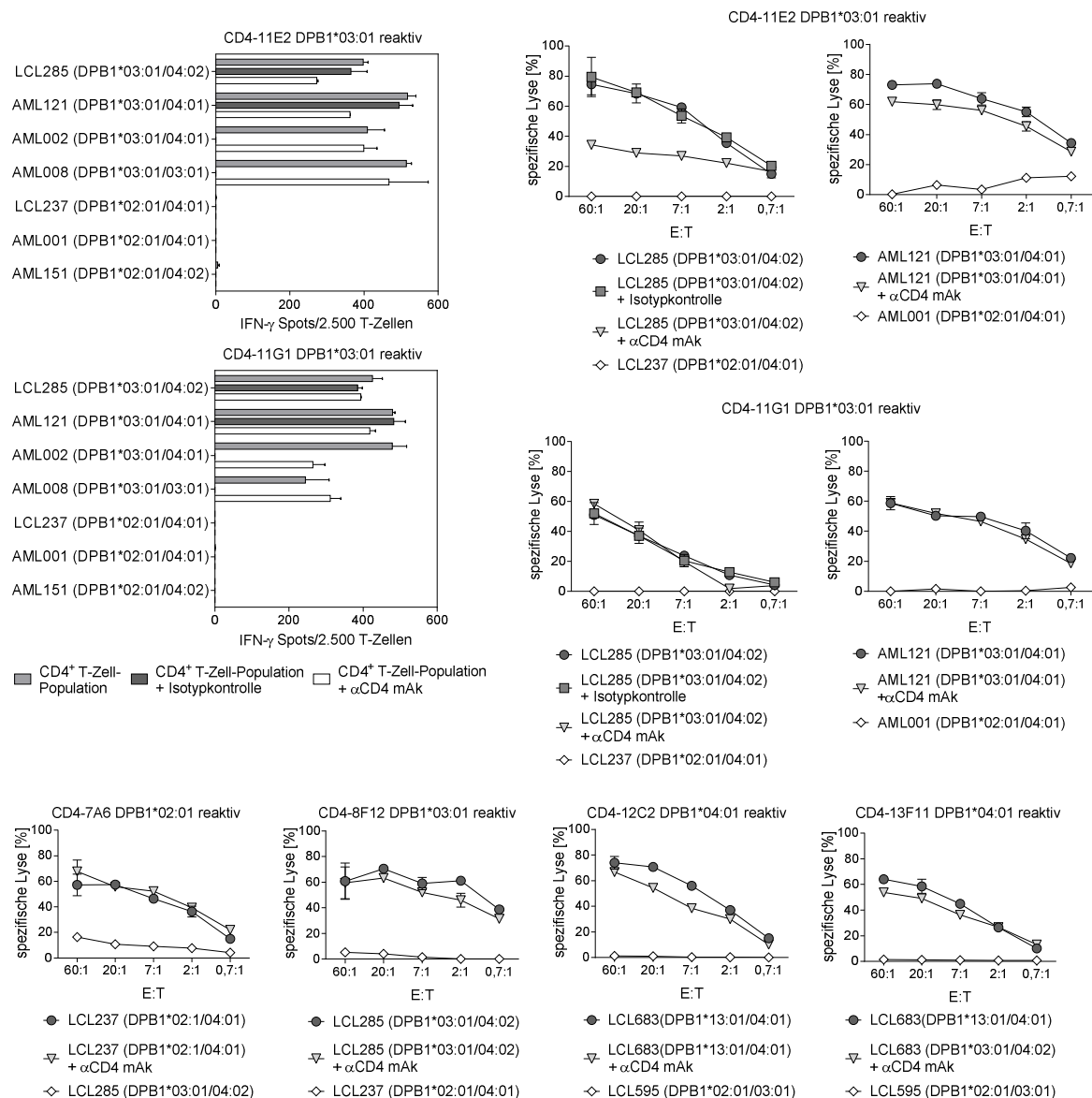


Abb. 3.26.: CD4 Korezeptorunabhängigkeit von allo-HLA-DPB1-spezifischen, Leukämie-reaktiven CD4⁺ T-Zell-Populationen. (a) allo-HLA-DPB1-spezifische Erkennung und (b) Lyse von allo-HLA-DPB1*03:01⁺ sowie allo-HLA-DPB1*03:01⁻ EBV-LCLs und allo-HLA-DPB1*03:01⁺ sowie allo-HLA-DPB1*03:01⁻ AML Blasten durch die T-Zell-Population 11E2, 11G1 (a, b) sowie weiteren T-Zell-Populationen (c). Zur Überprüfung der CD4 Korezeptorabhängigkeit wurde ein monoklonaler CD4 Korezeptor blockierender Antikörper (RPA-T4; 25 μ g/ml) sowie ein Isotyp-identer IgG1k mAk (P3.6.2.8.1; 25 μ g/ml) als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindung verwendet. Zur Analyse der spezifischen Erkennung wurde für jede T-Zell-Population (a) ein IFN- γ ELISpot mit 2,5 \times 10³ Effektoren und 5 \times 10⁴ der verschiedenen allo-HLA-DPB1*03:01⁺ sowie allo-HLA-DPB1*03:01⁻ Zielzellen und (b+c) ein ⁵¹Chrom-Freisetzungsstest durchgeführt. Die gezeigten Daten der ELISpot Analyse sind Mittelwerte zweier technischer Replikate \pm SEM. Die spezifische Lyse ist in Prozent angegeben und repräsentiert den Mittelwert zweier technischer Replikate \pm SD.

3.5.4 Kreuzreaktivität CD4 Korezeptor-unabhängiger, allo-HLA-DPB1-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Populationen gegen nicht-hämatopoetische Zielzellen

Auf Grund des potentiellen GvHD Risikos, welches für den Gebrauch von HLA-DP spezifischen T-Zellen unter inflammatorischen Bedingungen besteht, wurden auch die neu generierten T-Zell-Populationen auf ihr Potential, den GvHD Effekt zu vermitteln getestet¹¹⁵. Hierfür wurden die als Beispiel gezeigten 11E2 und 11G1 im IFN- γ ELISpot mit unbehandelten

sowie mit IFN- γ vorbehandelten allo-HLA-DPB1*03:01⁺ bzw. allo-HLA-DPB1*03:01⁻ Fibroblasten stimuliert. Es zeigte sich, dass die 11E2-Population die Fibroblasten nur dann erkannte, wenn diese zuvor unter inflammatorischen Bedingungen kultiviert worden waren. Dagegen schien die CD4⁺ T-Zell-Population 11G1 auf die Gewebezellen nicht zu reagieren, auch wenn durch IFN- γ die HLA-DP Expression erhöht wurde (Abb. 3.27).

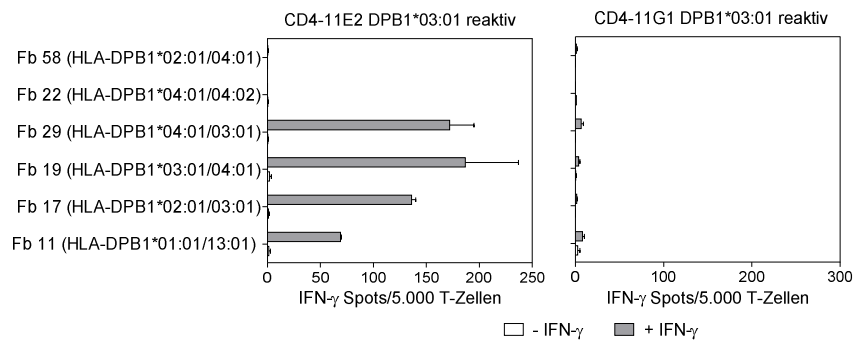


Abb. 3.27.: Untersuchung der Erkennung von Fibroblasten durch die allo-HLA-DPB1*03:01 spezifischen CD4⁺ T-Zell-Populationen 11E2 und 11G1. Allo-HLA-DPB1*03:01⁺ bzw. allo-HLA-DPB1*03:01⁻ Fibroblasten wurden für vier Tage ohne (□) bzw. mit IFN- γ (500U/ml, ■) kultiviert. In einer darauf folgenden IFN- γ ELISpot Analyse wurden 5×10^3 T-Zellen der Population 11E2 und 11G1 für 20 Stunden mit 5×10^4 allo-HLA-DPB1*03:01⁺ bzw. allo-HLA-DPB1*03:01⁻ Fibroblasten kultiviert und die IFN- γ Freisetzung gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte der IFN- γ Freisetzung \pm SEM von zwei technischen Replikaten eines T-Zell-Spenders.

3.5.5 Charakterisierung ausgewählter CD4 T-Zell-Populationen

Durch die Stimulation von naiven CD4⁺ T-Zellen mit autologen allo-HLA-DP tragenden mDZs unter CD4 Korezeptor blockierenden Bedingungen waren zahlreiche T-Zell-Populationen entstanden. Die vielversprechendsten T-Zell-Populationen wurden in Bezug auf das zytotoxische Potential, die dabei vermittelte CD4 Korezeptorunabhängigkeit und deren Klonalität des TZR V β -Ketten Repertoires weiter analysiert (Tab. 3.6). Dabei konnten drei Populationen identifiziert werden, die in Bezug auf das TZR V β -Ketten Repertoire monoklonal waren (T-Zell-Klon: 2E3, 4B4, 11G1). Die T-Zell-Klone 2E3 und 4B4 zeigten jedoch weder gegen allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCLs noch gegen allo-HLA-DPB1*04:01⁺ AML Blasten eine starke lytische Aktivität. Dagegen ist der allo-HLA-DPB1*03:01 spezifische T-Zell-Klon 11G1 sowohl in der Lage lytische Aktivität gegen allo-HLA-DPB1*04:01⁺ EBV-LCLs als auch insbesondere gegen allo-HLA-DPB1*04:01⁺ AMLs zu vermitteln. Diese Reaktivität ist dabei CD4 Korezeptor-unabhängig. Außerdem erkannte und lysierte dieser Klon Fibroblasten, unabhängig von inflammatorischen Begebenheiten, nicht. Zusammenfassend ist damit zu sagen, dass der CD4 Korezeptor-unabhängige, allo-HLA-DPB1*03:01 spezifische, Leukämie-reaktive T-Zell-Klon 11G1 sich besonders für die TZR-Isolation eignet.

Tab. 3.6.: Überblick der CD4⁺ T-Zell-Populationen. Allo-HLA-DPB1-reaktive T-Zell-Populationen wurden hinsichtlich ihrer Erkennung gegenüber autologen allo-HLA-DPB1 exprimierenden mDZs (ELISpot-Analyse bei einer E:T von 0,16:1) sowie der Abhängigkeit von einem CD4 Korezeptor untersucht. Auch das lytische Potential und die dabei vorhandene CD4 Korezeptorabhängigkeit gegenüber allo-HLA-DPB1 präsentierenden AML Blasten sowie EBV-LCLs wurde getestet. Des Weiteren wurde die Erkennung IFN- γ vorbehandelter Fibroblasten (Fb), sowie das TZR V β -Ketten Repertoire der einzelnen Populationen analysiert. Farblich wurden die beiden T-Zell-Populationen gekennzeichnet, deren Daten in den Abbildungen dieses Kapitels als repräsentative Daten dargestellt wurden (n.t.= nicht getestet, n.e.: nicht eindeutig ermittelbar).

Don	Stimuliert gegen	T-Zell-Population	IFN- γ Spotanzahl durch Erkennung autologer, HLA-DP transfizierter mDZs	CD4 Abhängigkeit bei der Erkennung autologer, HLA-DP transfizierter mDZs	Zytolytische Aktivität (E:T 20:1)		Korezeptor-abhängigkeit bei Lyse		TZR V β -Ketten Repertoire	Erkennung Fb unter IFN- γ
					AML	EBV-LCL	AML	EBV-LCL		
166	DPB1* 04:01	1B5	679	8%	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	V β 22 (77%)	n.t.
		1D8	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	V β 5.1 (5%) V β 14 (75%) V β 13.1 (10%)	n.t.
		2E3	1482	17%	16%	13%	19%	50%	V β 2 (99%)	n.t.
		2G11	401	11%	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.e.	n.t.
		4B4	653	3%	7%	28%	0%	18%	V β 2 (100%)	n.t.
		4E5	724	18%	14%	0%	100%	0%	n.t.	n.t.
	DPB1* 02:01	7A6	683	8%	46%	58%	6%	4%	n.t.	n.t.
		7E7	697	26%	50%	55%	64%	67%	n.t.	n.t.
		7G7	448	27%	25%	12%	80%	100%	n.t.	n.t.
129	DPB1* 03:01	8E7	765	5%	33%	7%	75%	23%	n.t.	n.t.
		8F12	469	23%	83%	70%	15%	10%	V β 13.1 (4%)	n.t.
		8H5	749	12%	33%	12%	87%	100%	n.t.	n.t.
167	DPB1* 02:01	10E11	512	44%	15%	32%	100%	25%	n.t.	n.t.
		10H8	845	3%	33%	7%	18%	100%	n.t.	n.t.
		11C9	477	18%	5%	0%	100%	0%	n.t.	n.t.
	DPB1* 03:01	11E2	637	11%	74%	69%	19%	57%	V β 8.2 (66%) V β 3.1 (33%)	ja
		11E8	637	0%	7%	10%	100%	100%	n.t.	n.t.
		11F9	363	30%	43%	0%	93%	0%	V β 17 (41%)	nein
		11F11	474	25%	23%	3%	86%	50%	n.t.	n.t.
		11G1	642	13%	51%	37%	0%	0%	V β 21.2 (100%)	nein
140	DPB1* 04:01	12B5	574	33%	38%	26%	81%	96%	n.t.	n.t.
		12C2	960	10%	68%	70%	28%	23%	n.t.	n.t.
		12D4	731	19%	49%	47%	63%	34%	n.t.	n.t.
		12E2	1010	12%	60%	0%	30%	0%	n.t.	n.t.
		12F1	1015	21%	71%	72%	84%	21%	n.t.	n.t.
		12H4	1061	27%	44%	58%	45%	48%	n.e.	n.t.
		12H12	982	2%	48%	17%	72%	65%	n.t.	n.t.
199	DPB1* 04:01	13F11	334	49%	64%	59%	50%	93%	n.e.	ja

4 Diskussion

Die allogene HSZT ist nach wie vor die einzige kurative Therapie für Patienten mit Hochrisiko- und therapierefraktärer AML^{48,49}. Ausschlaggebend für den Erfolg sind die im Transplantat enthaltenen T-Zellen, die eine Leukämie-reaktive Immunantwort induzieren und damit residuelle Leukämieblasten eliminieren können (GvL Effekt)^{64,195}. Jedoch besitzen eben jene Lymphozyten auch das Potential, schwerwiegende GvH Erkrankungen (GvHD) auszulösen, indem sie allo-Antigene auf anderen, nicht malignen Gewebezellen des Patienten erkennen und diese angreifen¹⁹⁶. Damit tragen alloreaktive T-Zellen des Spenders wesentlich zur transplantationsassoziierten Morbidität und Mortalität bei. Durch den adoptiven Transfer von selektionierten T-Zellen mit einer definierten, den GvL Effekt stärkenden Spezifität, könnte das Risiko einer GvHD minimiert werden. Hierfür ist die Identifikation geeigneter Antigene, welche eine Abgrenzung des nützlichen GvL Effekts von einer unerwünschten GvH Reaktivität erlauben, von essentieller Bedeutung.

In den letzten zehn Jahren konnten allo-HLA-DPB1 Allele als Zielantigene einer starken Leukämieaktivität eine immer größere Bedeutung für die T-Zell-Therapie nach HSZT zugeschrieben werden^{80,115,180}. HLA-DP wird vornehmlich auf Zellen der Hämatopoese und damit auf leukämischen Blasten exprimiert¹⁶. Jedoch kann die HLA-Klasse II Expression auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen durch proinflammatorischer Zytokine induziert werden⁹¹. Daher birgt die Verwendung allo-HLA-DPB1-reaktiver T-Zellen dennoch ein gewisses Risiko. Bestimmte, sog. permissive HLA-DPB1 Indifferenzen zwischen den Zellen des Transplantats und des Patienten besitzen laut verschiedener Studien trotz dessen keinen Effekt auf das Gesamtüberleben des Patienten, sind jedoch mit einer sinkenden Leukämierezidivrate nach allo-HSZT assoziiert^{108,109,114,115}. Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit zeigten, dass allo-HLA-DPB1 reaktive, zytolytische CD4⁺ T-Zell-Klone durch die Stimulation naïver CD4⁺ T-Zellen gesunder Spender mit HLA-Klasse I sowie –DR und –DQ identen, jedoch nicht HLA-DP-identen, primären Blasten eines AML Patienten, *in vitro* generiert werden können^{180,181}. Die dabei entstandenen CD4 T-Zell-Klone 2C4, 1F3 und 11C12 waren in der Lage *in vitro* allo-HLA-DPB1⁺ primäre Leukämiezellen spezifisch zu erkennen und zu lysieren. Zudem war der T-Zell-Klon 2C4 auch in der Lage allo-HLA-DPB1 exprimierende primäre AML Zellen in NSG Mäusen zu eradizieren. Jedoch ist der Zeit- und Kostenaufwand zur Isolation und Identifikation hochaffiner, Leukämie-reaktiver T-Zellen aus Patientenmaterial sowie die Amplifikation dieser Antigen-spezifischen T-Zellen bis zu einer für die Klinik anwendbaren Applikationsmenge sehr hoch¹²³. Zudem sinkt mit der Dauer der *in vitro* Kultivierung durch terminale Differenzierung die Funktionalität der T-Zellen^{120–122}. Der

Transfer TZR kodierender Gene eines ausgewählten, Antigen-spezifischen T-Zell-Klons in T-Zellen eines gesunden Spenders ist eine mögliche und bereits im autologen Setting klinisch angewandte Methode zur Überwindung dieser Hindernisse^{141,197}. In dieser Dissertation wurden daher die TZR-Gene aus den oben beschriebenen CD4⁺ T-Zell-Klonen 2C4, 1F3, 11C12 isoliert und deren Expression sowie funktionelle Eigenschaften nach Transfer in T-Zellen gesunder Spender überprüft. Die hier gewonnenen Daten sollen einen Beitrag dazu leisten, dass HLA-DPB1-spezifische, Leukämie-reaktive TZR zukünftig als ein schnell anwendbares „*off-the-shelf*“ Immuntherapeutikum in der adoptiven T-Zell-Therapie nutzbar werden können^{135,198}.

4.1 HLA-DP-spezifische TZR für die Immuntherapie der akuten myeloischen Leukämie

4.1.1 Expression HLA-DPB1-spezifischer TZR

In T-Zellen ist der CD3-Komplex ein limitierender Faktor für die Oberflächenexpression eines TZR^{142,199}. Durch die Integration eines TZR in eine allogene Spender T-Zelle entsteht, anders als bei der TZR-Expression der ursprünglichen T-Zell-Klone, zwischen eingebrachten und endogenem TZR ein Wettbewerb um den CD3-Komplex²⁰⁰. Auf Grund dieser Konkurrenz, aber auch der Möglichkeit der Entstehung von Falschpaarungen zwischen transferierten und endogenen TZR, kann die TZR-Expression transfizierter Spender Zellen sehr stark erniedrigt sein²⁰¹. Daher wurden anfängliche Testungen mit der Jurkat 76 Zelllinie durchgeführt. Diese besitzt keinen endogenen TZR, wodurch auch keine Konkurrenz zwischen endogenen und eingebrachten TZR um den CD3-Komplex entstehen kann. Hierdurch kann die Fähigkeit zur Dimerisierung der isolierten, in den Expressionsvektor pGEM4Z-64A¹⁵⁹ klonierten, über *in vitro* transkribierte RNA transfizierte TZR-Ketten analysiert werden. Die hierfür verwendete Art des Gentransfers wurde ausgewählt, da sie eine einfache und effiziente Methode zur Prüfung der Reaktivität eines exogen eingebrachten TZR in der Zielzelle darstellt. So ist es möglich, dass die Expression der in dieser Arbeit isolierten TZR, analog zu verschiedenen experimentellen Untersuchungen, schon nach wenigen Stunden auf der T-Zell-Oberfläche von transfizierten Zielzellen durchflusszytometrisch gemessen werden kann¹⁸⁴. Da bekannt ist, dass ein TZR-Komplex nur dann an der Oberfläche exprimiert wird, wenn die α - und die β -Kette sowie alle CD3-Ketten korrekt von der Zelle synthetisiert werden²⁰², zeigt eine Expression der exogen eingebrachten TZR sowohl, dass die beiden TZR-Ketten der isolierten TZR miteinander dimerisieren, als auch, dass die TZR effektiv von einer T-Zelllinie präsentiert werden können (Abb. 3.1). Auch CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen gesunder Spender, die einen endogenen TZR

besitzen, sind dennoch zu einer starken Expression der transfizierten TZR in der Lage. Dies unterstreicht, dass die angewandte Methodik, wie schon in verschiedenen experimentellen Studien gezeigt, einen effizienten Transfer und einen korrekten Zusammenbau auch von allo-HLA-DPB1 spezifischen TZR-Ketten gewährleistet^{135,184,203}. Die gewonnenen Daten zeigten jedoch auch, dass die verschiedenen TZR mit unterschiedlicher Stärke auf der Oberfläche exprimiert werden (Abb. 3.2). Eine unterschiedliche Expression kann durch die Affinität der TZR-Ketten untereinander, aber auch durch die Effizienz des TZR-Proteinfaltungsprozesses sowie der Stärke eines TZR den CD3 Komplex zu binden, begründet sein²⁰¹.

Da die funktionelle Avidität einer TZR transferierten T-Zelle von der Anzahl spezifischer TZR auf der Zelloberfläche abhängt, wurde die Expression der allo-HLA-DPB1 spezifischen TZR weiterhin durch verschiedene Sequenzmodifikationen weiter optimiert²⁰¹. Der hierzu zählende Komplettaustausch der konstanten, humanen gegen die konstanten, murinen Domänen eines TZR führte zu einer erhöhten TZR-Expression TZR_{DPB1*04:01} transfizierter Lymphozyten (Abb. 3.12). Aber auch die durch Sommermeyer und Uckert beschriebene Minimalmurinisierung, also der gezielte Austausch definierter, humaner Aminosäuren in der konstanten Domäne des TZR gegen murine Aminosäuren (TZR α : P90S, S92V, E91D, S93P; TZR β : E18K, S22A, F133I, E136A, Q139H)¹⁴⁴, führte zu einer Erhöhung der TZR-Expression TZR_{DPB1*06:01} transfizierter T-Zellen (Abb. 3.8). Grundlage für eine erhöhte Expression so modifizierter TZR waren Studien, die zeigten, dass murine TZR effektiver als humane TZR auf humanen T-Zellen exprimiert werden. Dies liegt darin begründet, dass murine TZR mit dem humanen CD3 einen stabileren Komplex bilden können und damit besser um das in limitierter Anzahl vorhandene CD3 Molekül konkurrieren^{204,205}. Außerdem kann die TZR-Expressionsstärke eines eingebrachten TZR auch davon beeinflusst werden, dass transfizierte TZR-Ketten auch mit endogenen TZR-Ketten eine sog. Fehlpaarung eingehen können. Durch eine solche Dimerisierung kommt es zu einer Reduktion der TZR-Oberflächenexpression. Murine TZR-Ketten dimerisieren jedoch präferentiell miteinander¹³⁴, wodurch weniger falsch gepaarten TZR-Heterodimere gebildet werden und die Expression der eingebrachten TZR steigt. Mit dem Ziel, dass die transfizierten TZR-Ketten hauptsächlich miteinander auf der T-Zell-Oberfläche exprimiert werden, wurde des Weiteren mittels Mutagenese der TZR_{DPB1*06:01} Sequenzen eine zusätzliche Disulfidbrücke zwischen der konstanten Domäne beider Rezeptorketten (TZR α/β T48 \rightarrow C) eingebracht. Analog zu Kuball und Kollegen konnte auch hierdurch eine Steigerung der TZR-Expression TZR_{DPB1*06:01} transfizierter T-Zellen erzielt werden^{146,147}. Im Gegensatz zu experimentellen Studien von Morris und Kollegen konnte jedoch kein additiver Effekt der Minimalmurinisierung und der Einbringung einer zusätzliche

Disulfid-Brücke erzielt werden (Abb. 3.8)²⁰⁶. Dies könnte daran liegen, dass die Verfügbarkeit der Komponenten zur Translation eines Proteins nicht in unerschöpflichen Mengen vorhanden sind und daher ein TZR selbst durch weitere Optimierung der TZR-Sequenz nicht noch stärker exprimiert werden kann.

4.1.2 Funktionalität HLA-DP-spezifischer TZR in humanen T-Zellen in Abhängigkeit von dem CD4 Korezeptor

Ein primäres Ziel dieser Doktorarbeit war zu untersuchen, ob die Übertragung der allo-HLA-DPB1 Spezifität durch den Transfer des aus dem allo-HLA-DPB1 spezifischen CD4⁺ T-Zell-Klonen isolierten TZR_{DPB1}, auf CD4⁺ jedoch auch auf CD8⁺ T-Zellen gesunder Spender möglich ist²⁰³. In ELISpot Analysen konnte gezeigt werden, dass sich allo-HLA-DPB1 Spezifitäten durch den Transfer von allo-HLA-DPB1 reaktiven TZR aus CD4⁺ T-Zell-Klonen in CD4⁺ T-Zellen gesunder Spender übertragen lassen (Abb. 3.4). Diese Ergebnisse gehen einher mit Studien zum Transfer HLA-Klasse I restringierter TZR aus CD8⁺ T-Zell-Klonen auf CD8⁺ Spender T-Zellen¹⁴¹. Bezüglich des Transfers der HLA-Klasse II restringierten TZR_{DPB1} in allogene CD8⁺ T-Zellen ließen sich jedoch unterschiedliche Beobachtungen machen. So konnte für CD8⁺ Zellen, die mit dem HLA-DPB1*06:01 oder auch mit dem HLA-DPB1*14:01-spezifischen TZR (TZR_{DPB1*14:01} aus T-Zell-Klon 2C4 bzw. TZR_{DPB1*06:01} aus T-Zell-Klon 1F3) transfiziert wurden, nur eine geringe IFN- γ Freisetzung durch die Stimulation mit allo-HLA-DPB1 exprimierenden EBV-LCLs in der ELISpot Analyse erfasst werden (Abb. 3.4). Willemsen und Kollegen publizierten 2005, dass CD4⁺ T-Zellen, die mit einem HLA-Klasse I MAGE-A1-spezifischen TZR transfiziert worden waren, nur dann die MAGE-A1-präsentierenden Melanomzellen eliminieren konnten, wenn zusätzlich zu den Rezeptorketten das Gen für die α -Kette des CD8 Korezeptors in die CD4⁺ T-Zelle eingebracht wurde²⁰⁷. Solche TZR werden als Korezeptor-abhängig bezeichnet. Nachfolgende Untersuchungen zur Identifizierung einer CD4 Korezeptorabhängigkeit des TZR_{DPB1*06:01} zeigten, dass sich die IFN- γ Spot Produktion von TZR_{DPB1*06:01} transfizierten CD4⁺ T-Zellen durch eine Antikörper-vermittelte Blockade des CD4 Korezeptors inhibieren lässt und die Funktionalität TZR_{DPB1*06:01} transfizierter CD8⁺ T-Zellen durch zusätzliche Einbringung der Gene eines CD4 Korezeptors in CD8⁺ T-Zellen zum Teil auf das Level einer TZR_{DPB1*06:01} transfizierten CD4⁺ T-Zelle angehoben werden kann (Abb. 3.6, Abb. 3.7). Daher ist die Vermutung naheliegend, dass es sich bei dem TZR_{DPB1*06:01} um einen CD4 Korezeptor-abhängigen TZR handelt. Tan und Kollegen postulierten jedoch, dass der CD8 Korezeptor durch seine Funktion der Stabilisation und Optimierung der Signalübertragung nur dazu beitrage, schwächere Liganden und damit ein größeres Repertoire an Zellen im Körper zu erkennen. Hoch-affine TZR könnten jedoch die

Notwendigkeit eines Korezeptors überwinden¹⁸⁵. Auch durch die in Kapitel 1.5.1 beschriebene Erhöhung der TZR-Oberflächenexpression kann die Funktionalität TZR_{DPB1*06:01} transfizierter T-Zellen in der ELISpot Analyse gegen allo-HLA-DPB1 exprimierende EBV-LCLs erhöht werden. Jedoch erreicht die Erkennung der CD8⁺ T-Zellen mit modifiziertem TZR_{DPB1*06:01} nicht das Level der CD8⁺ T-Zellen mit nicht modifiziertem TZR_{DPB1*06:01}, die zusätzlich mit einem CD4 Korezeptor transfiziert wurden (Abb. 3.8). Daraus ist zu schließen, dass die CD4 Korezeptorabhängigkeit nicht allein durch die Steigerung der TZR-Oberflächenexpression überwunden werden kann. Allerdings zeigten HLA-DPB1*06:01-spezifische CD4⁺, aber auch CD8⁺ T-Zellen, gegenüber allo-HLA-DPB1 exprimierenden primären AML Blasten des Patienten kaum Lyseverhalten (Abb. 3.9). Außerdem würde, durch das in der kaukasischen Bevölkerung geringe Vorkommen von HLA-DPB1*06:01 (1,83%), nur eine kleine Patientengruppe von einer Therapie mit diesem TZR profitieren¹⁰⁴. Aufgrund dieser Ergebnisse und Fakten wurden die Arbeiten mit diesem TZR eingestellt und damit auch keine weiteren Untersuchungen zur tatsächlichen Korezeptorabhängigkeit des TZR_{DPB1*06:01} durchgeführt.

Im Gegensatz zu den HLA-DPB1*06:01 bzw. HLA-DPB1*14:01-spezifischen TZR konnte eine Übertragbarkeit der allo-HLA-DPB1 Spezifität durch den HLA-DPB1*04:01-spezifischen TZR (TZR_{DPB1*04:01} aus T-Zell-Klon 11C12) auf CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden (Abb. 3.4). Dessen Funktionalität hinsichtlich der Lyse und IFN- γ Freisetzung gegenüber allo-HLA-DPB1 exprimierenden EBV-LCLs ließ sich durch Modifikationen der TZR-Sequenz analog der bereits beschriebenen Oberflächenexpression steigern (Abb. 3.11, Abb. 3.12).

4.1.3 Erkennung von primären AML Zellen durch HLA-DP-spezifische TZR *in vitro*

Inwiefern sich die Leukämieaktivität des T-Zell-Klons 11C12 durch den Transfer des aus diesem Klon isolierten TZR_{DPB1*04:01} auf allogene T-Zellen übertragen lässt, konnte durch die allo-HLA-DPB1*04:01-spezifische Reaktivität TZR_{DPB1*04:01} transfizierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gegenüber primären AML Blasten gezeigt werden. Durchflusszytometrische Analysen zur Stärke der HLA-DP Präsentation auf der Oberfläche der Leukämiezellen zeigten sehr unterschiedliche Expressionen dieses Moleküls zwischen den Blasten verschiedener Patienten auf (Tab. 3.4). Eine ungleiche Verteilung der HLA-DPB1 Expression wurde auch von Petersdorf und Kollegen beschrieben¹¹⁷. Zum einen konnten diese zeigen, dass die Stärke der Molekülpräsentation mit dem Vorkommen bestimmter *single nucleotide polymorphism* (SNP) Varianten der 3'UTR des DPB1 Genoms assoziiert ist. Zum anderen kann auch ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer erhöhten Expression durch eine SNP Variante

mit einem bestimmten DPB1 Allel hergestellt werden. So ist das Allel DPB1*03:01 mit der SNP Variante rs9277534G und rs2281389G mit einer hohen HLA-DPB1 Oberflächenexpression verknüpft²⁰⁸. Für 50% (2/4) der hier verwendeten HLA-DPB1*03:01 exprimierenden AML Blasten konnte eine sehr hohe HLA-DP Expression gemessen werden. Andere DPB1 Allele wurden dagegen in einem weit geringeren Maße exprimiert. Inwiefern diese Expression mit dem Auftreten verschiedener SNP Varianten korreliert, wurde hierbei nicht geprüft. Analog zu der HLA-Klasse I Expression lässt sich die HLA-DP Expression durch eine 24-stündige Vorbehandlung mit IFN- γ steigern (Abb. 3.13)¹⁸⁰. Funktionelle Analysen ergaben, dass fünf von sieben allo-HLA-DPB1*04:01⁺, jedoch keine allo-HLA-DPB1*04:01⁻ Leukämie-Blasten von TZR_{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen erkannt und lysiert werden. Wie bereits von anderen Forschergruppen beobachtet wurde, korreliert jedoch die Stärke der HLA-DP Expression nicht mit dem lytischen Potential der T-Lymphozyten¹¹¹. Eine induzierte Erhöhung der HLA-DP Expression auf AML-Blasten durch IFN- γ vermittelte keine weitere Steigerung der spezifischen T-Zell-Reaktivität. Auffällig ist, dass Blasten mancher Patienten schwächer erkannt (z.B. UKR128) und lysiert (z.B.: BB005, UKR120) werden als andere (Tab. 3.4). Einzig bei diesen Blasten zeigt die Induktion einer inflammatorischen Bedingung einen Effekt auf das zytolytische Potenzial, insbesondere von TZR_{DPB1*04:01} transfizierten CD8⁺ T-Zellen. Die Stärke der HLA-DP Expression scheint jedoch auch hierbei nicht der Hauptgrund für die unterschiedliche Funktionalität der T-Zellen zu sein. Dies lässt den Schluss zu, dass andere Mechanismen die Erkennung der Blasten durch die T-Zellen beeinflussen²⁰⁹. Grund hierfür könnten Vorgänge sein, die unter dem Sammelbegriff der Immunevasion zusammengefasst werden. Bei diesem entziehen sich die Blasten der Erkennung durch die T-Zelle, beispielsweise mit Hilfe eines erworbenen oder von Beginn der Tumorgenese an den Blasten innewohnenden spezifischen Mechanismus bzw. einer Mutation²¹⁰. Des Weiteren kann auch die Funktionalität der T-Zellen durch die Freisetzung inhibitorischer Enzyme²¹¹ oder Expression koinhibitorischer Moleküle vermindert werden²¹². Ob die Funktionalität der T-Zellen durch ein Immunevasionsmechanismus beeinflusst wird oder andere Faktoren bei der Stärke der Erkennung mancher Blasten durch die TZR_{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen eine Rolle spielen, wurde jedoch für die *in vitro* Testung nicht geprüft, sondern in nachfolgender *in vivo* Analyse weiter untersucht.

4.1.4 Funktion des HLA-DPB1*04:01-spezifischen TZR im Mausmodell

Zur Untersuchung der Effektivität TZR_{DPB1*04:01} exprimierender T-Zellen *in vivo* wurde der TZR_{DPB1*04:01} mittels retroviraler Transduktion in T-Zellen eingebracht. Dies bietet den Vorteil

einer stabilen Expression. Retroviral TZR_{DPB1*04:01} transduzierte T-Zellen wiesen in *in vitro* Analysen gleiche Funktionalitäten auf wie die zuvor getesteten TZR-RNA transfizierten Lymphozyten.

Zur *in vivo* Testung der Reaktivität TZR_{DPB1*04:01} transduzierter T-Zellen gegen AML Blasten wurden NSG Mäuse¹⁷⁴ verwendet, die mit Blasten von AML Patienten humanisiert wurden. NSG Tiere besitzen eine Reihe von genetischen Mutationen, wodurch eine effektive Ansiedlung hämatopoetischer Stammzellen¹⁷⁴ und Leukämieblasten^{175,176} gewährleistet werden kann. Außerdem fehlen diesen Tieren eigene reife T-, B- sowie NK-Zellen, wodurch sie für die Testung der Leukämie-reaktiven TZR_{DPB1*04:01} transduzierten Zellen besonders geeignet sind. Zusätzlich beeinflussen auch die der AML innewohnenden Faktoren die Etablierung humaner Leukämiezellen in der Maus. Hierzu zählt die für Menschen mit einer schlechten Prognose verknüpfte FLT3-ITD Mutation. Sanchez und Kollegen konnten zeigen, dass Blasten mit dieser Mutation besser in NSG Mäuse anwachsen können als Blasten ohne eine FLT3-ITD Mutation¹⁷⁶. Für *in vivo* Studien wurden deshalb AML Blasten der FLT3-ITD mutierter Leukämien verwendet. Zu diesen zählen auch die Leukämien der Patienten UKR121 und UKR167, von denen gezeigt werden konnte, dass sie effektiv in NSG Mäusen anwachsen und deren Applikationsdosis auf ein AML-Blastenniveau nach 21 Tagen von 1-5% AML Blasten im Knochenmark der Mäuse titriert wurde. Diese Infiltrationsrate entspricht dabei dem Prozentsatz von AML-Blasten im Knochenmark eines Patienten, bei der von einer minimalen Resterkrankung (engl.: *minimal residual disease*, MRD) gesprochen werden kann. Da eine Immuntherapie zu diesem Zeitpunkt erwiesenermaßen am effektivsten wirkt, wurde in den *in vivo* Analysen eine Infiltrationsrate entsprechend der klinischen Situation einer MRD gewählt¹⁹⁰.

Um ein optimales Umfeld für T-Zell-Proliferation, -Differenzierung und -Überleben im Maussystem herzustellen, wurden mit Gabe der retroviral transduzierten T-Zellen nach Erreichen einer MRD die Zytokine IL-2 und Fc IL-7 appliziert. Dabei spielt IL-2 eine wichtige Rolle für das T-Zell-Wachstum sowie die T-Zell-Differenzierung und IL-7 bei der Proliferation und dem Überleben insbesondere von CD4⁺, aber auch von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen^{174,213}. Um die Stabilität des Zytokins im Mausserum zu erhöhen wurde IL-7 verwendet, welches kovalent an einen IgG Fc Teil gebunden ist^{214,215}.

In den vorangegangenen *in vitro* Analysen konnte die Stärke der HLA-DPB1*04:01-spezifischen Reaktivität von TZR_{DPB1*04:01} transfizierten CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen gegen die Blasten der UKR121 in Bezug auf Erkennung und lytisches Potential eindeutig gezeigt werden (Tab. 3.4). Dennoch waren sowohl TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen in

in vivo Analysen nur in äußerst geringem Maße in der Lage, UKR121 Blasten *in vivo* zu eliminieren (Abb. 3.19). Hinrichs und Kollegen konnten in ihren Studien zeigen, dass T-Zellen, die aus dem naïven Kompartiment stammen, im Vergleich zu Gedächtniszellen, vielerlei Vorteile im Hinblick auf die adoptive Immuntherapie mit sich bringen. Sie sind zum einen zu einer erhöhten Expression des Transgens sowie zu einer robusteren Proliferation fähig. Zum anderen besitzen sie eine Resistenz gegenüber terminaler Differenzierung und damit gegenüber T-Zellerschöpfung¹⁹². Jedoch hatten weder CD45RA⁺ TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ noch CD8⁺ T-Zellen einen Einfluss auf die Proliferation der Leukämieblasten des Patienten UKR121 im Mausmodell.

Da trotz starker *in vitro* Reaktivität der TZR_{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen die *in vivo* Funktionalität gegen die Blasten des Patienten UKR121 ausblieb, wurden auch hierbei Immunevasionsmechanismen als Grund für das Versagen der T-Zellen in Betracht gezogen. Mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen der Leukämiezellen vor der Injektion in die NSG Tiere und sieben Tage nach der Applikation TZR_{DPB1*04:01} transfizierter T-Zellen wurde die Expression verschiedener immunregulatorischer Oberflächenmoleküle analysiert (Abb. 3.20). Hierbei zeigte sich, dass die Blasten des Patienten UKR121 der Erkennung durch das Immunsystem, unter anderem durch die Reduktion der HLA-DP Expression, entgehen können. Eine Reduktion der Expression von HLA-Klasse I Moleküle oder anderer HLA-Klasse II Moleküle konnte schon in verschiedenen anderen Tumorzellen nachgewiesen werden^{193,216}. Daher ist es möglich, dass auch für die Expression von HLA-DP ein solcher regulierender Mechanismus existiert. Mutationen der zellulären Maschinerie, welche für die Präsentation des HLA:Peptid Komplexes auf der Zelloberfläche zuständig sind²¹⁷, aber auch Immuneditierungsprozesse werden hierfür verantwortlich gemacht²¹⁸. Bei der Immuneditierung handelt es sich in diesem Fall um einen Prozess, welcher zur Zerstörung stark HLA exprimierender AML Blasten und damit zur Selektion der Varianten mit geringer HLA-Expression führt.

Des Weiteren konnte eine leichte Expressionssteigerung des mit dem Checkpoint-Molekül PD-1 (engl.: *programmed cell death protein 1*) interagierenden Liganden PD-L1 auf den Blasten des Patienten UKR121 gemessen werden. Dies ist einhergehend mit Daten zur erhöhte PD-L1 Expression auf AML Zellen nach Kontakt mit zytotoxischen T-Zellen^{219,220}. PD-1, welches als Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen, aber auch auf B-Zellen präsentiert wird, fungiert als negativer Regulator aktivierter T-Zellen²²¹⁻²²². In der vorliegenden Arbeit konnte aber auch eine stark erhöhte PD-1 Expression auf den AML-Blasten *ex vivo* im Vergleich zur Expression vor der Injektion in die Maus detektiert werden. Als Oberflächenrezeptor wird PD-1

zwar vornehmlich von T-Zellen präsentiert, aber auch eine Expression auf Tumorzellen solider Krebsarten konnte bereits beschrieben werden. Hierbei war die Expression des Rezeptors mit einer schlechten Prognose assoziiert²²³. Daten zu PD-1-präsentierenden AML Blasten sind jedoch nicht vorhanden. Daher ist eine abschließende Bewertung, ob die verstärkte PD-1 Expression nach Kontakt mit der T-Zelle zur Immunevasion der UKR121 beiträgt, nicht vollumfänglich möglich.

Auch die Expression des CD28/CTLA-4 Ligand CD86 war nach Antigenkontakt *in vivo*, in Vergleich zur Expression vor der Applikation in die Maus, erhöht. Da CD86 mit CTLA-4 auf aktivierten T-Zellen einen inhibitorischen Effekt ausübt²²⁴ und die CD86 Expression auf AML Blasten mit einer schlechten Prognose des Patienten assoziiert ist²²⁵, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei auch um einen Immunevasionsmechanismus der AML Blasten handelt. TIM-3 wird auf leukämischen Stammzellen exprimiert. Wird dieser durch GAL-9 stimuliert, werden Gene, die für das Überleben der AML Zelle wichtig sind, heraufreguliert²²⁶. Die *in vitro* sowie die *ex vivo* Daten zeigen jedoch kaum TIM-3 sowie LAG-3 und CD80 auf den Blasten des Patienten UKR121, sodass ein Immunevasionsmechanismus durch diese Faktoren ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten schließen, dass die Blasten des Patienten UKR121 auf Grund Immunevasionsmechanismen vor allem durch Reduktion der HLA-DP Expression, aber auch potentiell durch Steigerung der Expression von PD-1, PD-L1 sowie CD86 in der Lage sind, der Erkennung und damit der Lyse durch TZR_{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen effektiv zu entgehen. Daher wurde die Funktionalität der T-Zellen im Zusammenhang mit einer weiteren AML (UKR 167) getestet. Daten aus dieser Testung sind jedoch Einzelresultate und müssen daher unter dem Vorbehalt weiterer Testungen betrachtet werden (Abb. 3.21). Nichts desto trotz zeigten diese Versuche, dass TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ T-Zellen in der Lage sind, die Leukämie des Patienten UKR167 effektiv *in vivo* zu eliminieren.

4.1.5 Reaktivität von T-Zellen mit HLA-DPB1*04:01-spezifischen TZR gegen nicht-hämatopoetische Zellen

Um die Gefahr einer durch TZR_{DPB1*04:01} transfizierte T-Zellen ausgelöste GvHD beurteilen zu können, wurde die Zytokinfreisetzung sowie das zytolytische Verhalten TZR modifizierter T-Zellen gegenüber nicht-hämatopoetischen Gewebezellen analysiert. Dabei erkennen und lysieren TZR transfizierte T-Zellen unter nicht-inflammatorischen Bedingungen primäre Fibroblasten und die Keratinozytenzelllinie HaCaT nicht (Tab. 3.5 und Abb. 3.16). Analog zu der natürlichen, durch chemotherapeutische Behandlung oder durch Infektionen entstandenen

Zytokinsituation wird durch Vorbehandlung der Gewebezellen *in vitro* mit dem proinflammatorischen Zytokin IFN- γ , die HLA-DP Expression auf der Zelloberfläche von Fibroblasten und Keratinozyten hochreguliert (Tab. 3.5)¹⁸⁹. Während TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen die behandelten Zellen erkennen, werden diese ausschließlich durch TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD8⁺ T-Zellen lysiert (Tab. 3.5 und Abb. 3.16). Auch Rutten und Kollegen sowie unsere Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass CD4⁺ T-Zellen, welche aus Patienten mit lymphoplasmozytischem Lymphom nach DLI Therapie isoliert bzw. *in vitro* generiert wurden, Fibroblasten nur nach IFN- γ Vorbehandlung HLA-DP-spezifisch erkennen^{115,180}.

4.1.6 Risiken und Potential einer HLA-DPB1*04:01-spezifischen TZR-Therapie

Aus den durch Verwendung des TZR_{DPB1*04:01} erzielten Ergebnissen und den für deren Erreichung verwendete Methoden ergeben sich jedoch auch gewisse Risiken. Zu diesen zählen zum einen das GvHD Potenzial TZR_{DPB1*04:01} modifizierter T-Zellen unter inflammatorischen Bedingungen, zum anderen die Gefahren, die durch die retrovirale Transduktion, aber auch durch die durchgeführten Modifikationen der TZR-Sequenzen entstehen.

Aus den *in vitro* Daten der Stimulation TZR_{DPB1*04:01} exprimierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gegen nicht-hämatopoetische Zellen kann geschlossen werden, dass mit diesem Rezeptor transfizierte Lymphozyten das Potential haben, im menschlichen Körper die Entwicklung eines GvH Effektes zu fördern. Denn durch beispielweise Gewebeschädigungen, verursacht durch chemotherapeutische Behandlungen oder durch virale Infektionen, kann im Patienten ein inflammatorisches Milieu entstehen, welches eine HLA-Expression auf GvHD Zielzellen, wie Gewebezellen, fördert. Für die potentielle klinische Anwendung von T-Zellen mit dem hier untersuchten TZR bedeutet dies, dass eine Applikation analog der klinischen Praxis für unmanipulierte DLI sinnvoll wäre. Diese wird nur im „nicht-entzündlichen klinischen Status“ verabreicht und dient damit der Minimierung der Gefahr, welche durch die Erhöhung der Expression von allo-HLA-DP Molekülen durch proinflammatorische Zytokine entsteht¹⁰⁷.

Für die Balance zwischen GVL Reaktivität und der unerwünschten GvHD spielt außerdem auch die Menge der applizierten T-Zellen eine Rolle¹³⁹. Um das Risiko einer GvHD zu minimieren, sollte daher die T-Zell-Menge, die zur vollständigen Eliminierung einer MRD ausreicht, *in vivo* ermittelt werden.

Auch die retrovirale Transduktion der T-Zellen, welche für die *in vivo* Analysen verwendet wurden, ist mit gewissen Risiken assoziiert. So besteht bei der Nutzung retroviraler Vektoren zum stabilen Transfer der TZR-Gene in die T-Zellen das Risiko der Insertionsmutagenese²²⁷.

Bei dieser integrieren gammaretrovirale *long terminal repeats* (LTR) Vektoren vorzugsweise in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes eines Genes. Dabei können diese Gene über die LTR-Region aktiviert werden. Dies kann zur Dysregulation von Onkogenen oder der Transkriptionsaktivität anderer regulatorischer Gene führen²²⁸. Klinische Studien zeigten schwerwiegende Nebenwirkungen als Folge von Insertionsmutagenese nach Transplantation transduzierter hämatopoetischer Stammzellen¹³¹. Jedoch wird zurzeit angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit der Wandlung reifer T-Zellen zu malignen Zellen durch retrovirale Integration sehr gering ist²²⁹. Zum anderen birgt die stabile Expression eines unter inflammatorischen Bedingungen potentiell GvHD vermittelndem TZR_{DPB1*04:01} eine Gefahr für den Patienten. Um diese Faktoren zu umgehen, können entweder spezielle Sicherheitsmechanismen für die Gabe TZR_{DPB1*04:01} retroviral transduzierter T-Zellen etabliert oder eine RNA Transfektion von Spenderzellen, bei der die TZR-Expression nur von zeitweiliger Dauer ist, in Betracht gezogen werden. Die Möglichkeiten eine T-Zelle oder einen TZR genetisch so zu verändern, dass diese bei Bedarf zerstört oder die TZR-Expression durch Applikation gewisser Reagenzien heraus- sowie herabreguliert werden kann, sind in den letzten Jahren immer vielfältiger geworden^{230,231}. Durch sog. Suizidgentechnologien können adoptive transferierte T-Zellen bei Auftreten einer T-Zell vermittelten Toxizität gezielt eradiziert werden, während der Prozess der Immunrekonstitution der unmodifizierten T-Zellen weiterhin ablaufen kann. Dabei werden die verschiedenen sog. Suizidgentechnologien auf Grund ihrer diversen Wirkmechanismen in metabolisch, Dimerisierung-induzierte oder durch therapeutische monoklonale Ak vermittelte Wirkmechanismen unterschieden. Bei der erstgenannten Technologie werden nicht toxische Moleküle durch die Suizidgen-modifizierten T-Zellen in toxische Moleküle umgewandelt. Hierzu zählt das Herpes Simplex Virus-Thymidin Kinase (HSV-TK)/Ganciclovir (GCV) System. Von der Thymidin Kinase des HSV ist bekannt, dass sie GCV mit einer größeren Affinität als die des Menschen phosphorylieren kann. Durch Einbringung dieser Virusgene in die T-Zelle werden die bei Auftreten von Toxizitäten verabreichten Nukleosidanalogons phosphoryliert. Dieses Analogons inhibiert durch Inkooperation die DNA Synthese und führt damit zum Zelltod sich teilender Zellen²³⁰. Zu den durch Dimerisierung induzierten Apoptosegenen gehört die induzierbare Caspase 9 (iCasp9), welche durch die Applikation des dimerisierenden Medikaments AP1903 aktiviert wird und damit zum Zelltod von Caspase 9 exprimierenden Zellen führt²³². Eine weitere Strategie zielt darauf ab, Zielzellen genetisch in der Art zu verändern, dass sie einen bestimmten Rezeptor exprimieren, wodurch die Zellen mittels Gabe von spezifischen monoklonalen Ak aus dem Körper des Patienten entfernt werden können. Hierzu zählt die endogen etablierte

Expression des humanen, trunkierten Zelloberflächen Polypeptid EGFR (engl.: *epidermal growth factor receptor*; huEGFRt). Durch die Zugabe des monoklonalen Antikörpers Cetuximab wird eine selektive Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität induziert, die zur *in vivo* Depletion der T-Zellen führt²³³. Diese Mechanismen haben gemein, dass die adoptiv transferierten T-Zellen bei ersten Anzeichen einer GvHD oder anderer Toxizitäten eliminiert werden können. Zudem konnten klinische Studien die Effizienz der iCasp9 und der HSV-TK bestätigen konnten^{234,235}. Nichts desto trotz führen diese Strategien zu einer irreversiblen Eliminierung der T-Zellen, deren Herstellung mit hohen Kosten verbunden und sehr komplex ist^{236,237}. Daher zielen neuere Methoden auf die Herstellung eines TZR, dessen Expression bei Bedarf herauf, aber auch wieder herabreguliert werden kann. Erste Studien zu dieser Art von Rezeptoren kommen aus dem Bereich der chimären Antigenrezeptor (CAR)-Therapie. CARs bestehen im Allgemeinen zum Teil aus einer Antigen-spezifischen extrazellulären Bindedomäne. Diese wird durch ein Einzelkettenfragment (scFv), welches hauptsächlich aus der Fusion der variablen Regionen der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) eines monoklonalen Antikörpers entsteht, gebildet. Diese Bindedomäne ist über eine Transmembrandomäne mit einer intrazellulären T-Zell-spezifischen Signaldomäne sowie kostimulatorischen Molekülen verbunden¹²³. Um die Expression des Rezeptors zu kontrollieren, entwickelten Wu und Kollegen eine Methode, bei der die Antigen-bindenden und die Signal-transduzierenden Komponenten des CAR in zwei Polypeptidketten aufgetrennt werden und jede Kette mit einer heterodimerisierenden Domäne verbunden wird. Bei diesen Domänen handelt es sich um die FK506 bindende Domäne (engl.: *FK506 binding protein*; FKBP) des FK506 bindenden Proteins mit der Molekularmasse von 12kDa (FKBP12) und die T2089L Mutante des FKBP-bindenden Proteins FRAP (engl.: *FKBP-rapamycin binding*; FRB*). Diese können nur durch Gabe eines heterodimerisierenden Moleküls (Rapamycin Analogon AP21967) assemblieren, wodurch eine Dimerisierung und somit eine Signalweiterleitung in die T-Zelle ermöglicht wird²³⁸. Eine andere Studie beschreibt die Verwendung eines Systems aus zwei Rezeptoren, wodurch zwei spezifische Antigene für die Aktivierung der T-Zelle von Nöten sind. Erkennt der erste Rezeptor das spezifische Antigen A (z.B. CD19), aktiviert dies die Transkription des CARs, der durch Bindung des Antigens B (z.B. Mesothelin) die T-Zelle aktivieren kann²³⁹. Vor allem der erste Mechanismus würde die Verwendung stabil TZR_{DPB1*04:01} transduzierter T-Zellen sicherer machen und sollte für weitergehende Versuche in Betracht gezogen werden.

Bei der Verwendung der transienten Transfektion mittels *in vitro* transkribierter RNA bestehen die Risiken, die mit der retroviralen Transduktion verbunden sind, nur bedingt. Denn die durch

IVT RNA generierte TZR-Expression ist auf Grund der limitierten Menge, der durch die Elektroporation übertragenen RNA und deren kurzer Halbwertszeit nur von kurzweiliger Dauer (5-7 Tage, Abb. 3.3)¹⁸⁴. Dies bietet den Vorteil, dass eine TZR_{HLA-DPB1} vermittelte GvHD, aber auch eine nicht zielgerichtete (*off-target*) Reaktion, beispielsweise ausgelöst durch Falschpaarung der TZR-Ketten mit den endogenen TZR-Ketten, nur kurzzeitig auftritt¹³⁷. Deshalb sollte die Reaktivität transient TZR_{DPB1*04:01} transfizierter T-Zellen auch *in vivo* zunächst durch eine einzelne T-Zell-Gabe überprüft werden. Eine repetitive Gabe würde eine erhöhte Gefahr durch das Alloreaktivitätspotential des HLA-DPB1*04:01-spezifischen TZR darstellen^{139,140}. Diese wäre jedoch von Nöten, wenn eine einzelne T-Zell Applikation nicht für den gewünschten Effekt ausreicht. Unsere Arbeitsgruppe konnten jedoch zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen, die phänotypisch den Gedächtniszellen zugeordnet werden können, im Vergleich zu naiven T-Zellen ein geringeres GvHD Potential aufweisen und dazu nach TZR-RNA Transfektion eine verbesserte anti-leukämische Effektorreaktivität vermitteln^{73,135,240}. Somit sollte im Falle der wiederholten T-Zell-Applikation, insbesondere in Bezug auf die klinische Anwendung, der Effekt TZR_{DPB1*04:01} transfizierter Gedächtnis-T-Zellen überprüft werden.

Im Gesamten darf jedoch trotz der beobachteten Vorteile, die eine Steigerung der Funktionalität mit sich bringt, auch nicht außer Acht gelassen werden, dass die Art der zur Verbesserung der Oberflächenexpression verwendeten TZR-Sequenzmodifikationen gewisse Gefahren birgt. So kann die Einbringung nicht humaner Peptidsequenzen durch die Murinisierung eine Immunreaktion hervorrufen, durch welche die Langlebigkeit der eingebrachten T-Zelle *in vivo* reduziert wird^{144,241,242}. Diese kann auch durch die Kodonoptimierung beeinträchtigt werden. Denn auch hierbei besteht die theoretische Gefahr einen potenziell immunogenen Rezeptor zu generieren. Durch die Optimierung könnte ein alternativer offener Leserahmen entstehen, was eine Änderung der Peptidsequenz zur Folge haben könnte²⁰⁶.

Zusammenfassend zeigen die im ersten Teil dieser Arbeit gesammelten Daten, dass die Übertragung der Reaktivität der HLA-DPB1-spezifischen, Leukämie-reaktiven CD4⁺ T-Zell-Klone durch den Gentransfer der aus den Klonen isolierten TZR_{DPB1} auf T-Zellen gesunder Spender möglich ist. Dabei verdeutlichen insbesondere die mit dem TZR_{DPB1*04:01} erzielten Ergebnisse das Potential einer HLA-DPB1 spezifischen TZR-Therapie für AML Patienten nach allogener HSZT Therapie. Unter Einbeziehung der Risiken und der verschiedenen, oben beschriebenen Lösungsansätze zur Minimierung dieser Risiken, ist eine Anwendung des TZR_{DPB1*04:01} als schnell einzusetzendes „*off-the-shelf*“ Immuntherapeutikum für rezidivierende AML Patienten mit einem nicht-entzündlichen klinischen Status denkbar.

4.2 Generierung von HLA-DP-spezifischen, CD4 Korezeptor-unabhängigen CD4⁺ T-Zell-Klonen

Die TZR-Therapie ist eine wertvolle Möglichkeit T-Zellen, mit einer definierten Antigenspezifität zu generieren. Dabei beschäftigen sich die meisten Untersuchungen bisher mit der Isolation Tumorantigen-spezifischer HLA-Klasse I restringierten TZR aus CD8⁺ T-Zellen und deren Transfer in CD8⁺ Spender T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen übernehmen zwar klassischerweise Helferfunktionen. Einige Studien, unter anderem von Stevanovic und Kollegen, konnten jedoch auch *in vivo* am Beispiel Leukämie-reaktiver CD4⁺ T-Zellen die anti-leukämische Reaktivität dieses T-Zell-Subtyps beweisen⁸⁰. Während andere Untersuchungen darlegten, dass diese Subpopulation in manchen Fällen sogar CD8⁺ T-Zellen in ihrer anti-Tumor Effektorfunktion übertrifft und CD4⁺ T-Zellen selbst dann, wenn keine HLA-Klasse II Moleküle von Tumorzellen exprimiert werden, eine indirekte Tumorreaktivität vermitteln⁸². Die im ersten Teil dieser Dissertation generierten Daten unterstreichen ebenfalls, dass mit der HLA-Klasse II Reaktivität des HLA-DPB1 spezifischen TZR eine effektive Leukämiereaktivität vermittelt werden kann. Studien zeigten jedoch auch, dass eine kombinierte Gabe von CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Zell-Populationen einen therapeutischen Vorteil verschafft und dass durch die Verwendung einzelner Subtyppopulationen die therapeutische Effizienz nur in limitierten Maße vorhanden ist^{243,244}. Daher wäre es in Bezug auf die TZR-Immuntherapie von Vorteil, TZR einzusetzen, die sowohl in CD4⁺ als auch in CD8⁺ T-Zellen zur uneingeschränkten Aktivierung der T-Zelle führen würden, sodass ein synergistischer Effekt gegen ein bestimmtes Zielantigen erzielt werden kann^{150,245,246}. Die in verschiedensten Untersuchungen gemachten Beobachtungen und die in dieser Arbeit erzielte Ergebnisse legen jedoch dar, dass die Aktivierung einer T-Zelle und damit deren Zytokinproduktion, aber auch die Zielzellerkennung von der Präsenz eines Korezeptors abhängt^{247,248}. Außerdem entstehen natürlicherweise Korezeptor-unabhängige T-Zell-Klone, wie im Falle des CD4⁺ T-Zell-Klons 11C12, nur sehr selten (Abb. 3.10)^{247,248}. Daher wurde im zweiten Teil dieser Doktorarbeit eine Methode zur gezielten Generierung Korezeptor-unabhängiger, Tumor-reaktiver T-Zellen etabliert (Abb. 3.22). Diese beruht dabei im Wesentlichen auf einer Modifikation der von unserer Arbeitsgruppe beschriebenen und publizierten Herstellung HLA-DPB1-spezifischer, Leukämie-reaktiver T-Zell-Klone¹⁸⁰. Dafür wurden naïv angereicherte CD4⁺/CD45RA⁺ Spender T-Zellen mit durch RNA-Transfektion allo-HLA-DPB1-präsentierenden, reifen mDZs des gleichen Spenders stimuliert. Um eine CD4 Korezeptorunabhängigkeit bei der Generierung der T-Zell-Klone zu etablieren, wurde im Unterschied zum publizierten Verfahren die Bindung des CD4 Korezeptors an das HLA-Klasse

II Molekül inhibiert. Hierfür wurde der CD4 Korezeptor der T-Zellen in den ersten vier Stimulationsrunden durch die Bindung eines monoklonalen anti-CD4 Antikörpers an den Korezeptor vor der Zugabe der allo-HLA-DP-präsentierenden mDZs blockiert. T-Zellen, die ohne diesen Korezeptor, welcher zum einen die Stabilisierung des HLA:Peptid:TZR-Komplexes vermittelt und zum anderen wichtig für die Aktivierung einer T-Zelle ist, ein weniger starkes bis nicht vorhandenes Signal für die T-Zell-Aktivierung bekommen, verkümmern über die Zeit. In der Konsequenz proliferieren nur T-Zellen, deren Aktivierung nicht abhängig von ihrem Korezeptor ist und welche daher in funktionellen Analysen eine CD4 Korezeptorabhängigkeit vermitteln sollten.

In Korrelation zu den Ergebnissen unsere Arbeitsgruppe konnten durch dieses Protokoll auch in dieser Arbeit allo-HLA-DPB1 spezifische T-Zell-Populationen mit ähnlichen funktionellen Eigenschaften generiert werden^{180,181}. So konnte die spezifische HLA-DP-abhängige Reaktivität generierter T-Zell-Populationen nicht nur anhand der reduzierten IFN- γ Spot Produktion, die durch Inhibition der HLA-DP:TZR-Bindung mittels HLA-DP blockierenden monoklonalen Antikörper auftrat, bestätigt werden (Abb. 3.23). Auch in funktionellen Analysen konnte unter Verwendung von autologen allo-HLA-DPB1 exprimierenden mDZs eine gegen allo-HLA-DPB1 gerichtete Reaktivität generierter T-Zell-Populationen dargestellt werden. Dabei war jedoch mit einem Wert von 60% der Anteil der allo-HLA-DPB1 reaktiven T-Zell-Populationen, ermittelt durch die Testungen der entstandenen T-Zell-Populationen gegen autologe sowie allo-HLA-DP transfizierte mDZs, vergleichsweise hoch (Abb. 3.23)²⁴⁹. Die generierten T-Zellen zeigten sich in IFN- γ ELISpot und ⁵¹Chrom-Freisetzungstestungen gegen allo-HLA-DPB1 präsentierenden AML-Blasten sowie EBV-LCLs sowohl in der Lage, hämatopoetische Zellen myeloiden Ursprungs, als auch Zellen der lymphoiden Reihe zu erkennen und zu lysieren (Abb. 3.24). Einzelne T-Zell-Populationen, welche allo-HLA-DPB1-spezifische Reaktivität gegen transfizierte mDZs zeigten, vermittelten jedoch keine Aktivität gegen entweder allo-HLA-DPB1-präsentierende EBV-LCLs, AML Blasten oder sogar gegen beide Zelltypen (Tab. 3.6). Im Falle der Blasten könnte eine Begründung in den oben beschriebenen Immunevasionsmechanismen (Kapitel 4.1.4) zu finden sein. Auf der anderen Seite ist bei dem Vorgang der Alloreaktivität zu bedenken, dass diese nicht nur durch die Erkennung allogener HLA Moleküle auf der Oberfläche der Zielzelle durch den TZR ausgelöst werden. Diese Interaktion kann auch peptidabhängig sein²⁵⁰. Präsentieren Blasten nun andere Peptide, wie die endogenen Peptide der zur Stimulation der T-Zell-Populationen verwendeten gereiften, allo-HLA-DPB1-präsentierenden mDZs, so können peptidabhängige T-Zell-Populationen diese nicht erkennen. Des Weiteren konnten durch das Stimulationsprotokoll

T-Zell-Populationen generiert werden, die nicht-hämatopoetisches Gewebe, in diesem Fall Fibroblasten, unter normalen Bedingungen nicht erkennen, die Erkennung jedoch unter inflammatorischen Bedingungen induziert wurde (Abb. 3.27). Für diese Population besteht ein potentiell Risiko der Induktion einer GvHD. Dieses entsteht durch Heraufregulation der HLA-DP Expression durch proinflammatorische Zytokine, die beispielsweise im AML Patienten durch Schädigungen des Gewebes durch Radiotherapie während der Konditionierung sowie virale Infektionen entstanden sind. In dieser Arbeit konnten jedoch ebenfalls T-Zell-Populationen isoliert werden, die auch unter inflammatorischen Bedingungen Gewebezellen nicht erkennen. Diese Populationen sind daher besonders attraktiv für die adoptive T-Zell-Therapie sowie den Gentransfer deren TZR in allogene T-Zellen gesunder Spender.

Im Gesamten bestätigen die hinsichtlich der allo-HLA-DPB1 Reaktivität gewonnenen Ergebnisse die starke Spezifität der so isolierten T-Zell-Populationen und unterstreichen damit die Daten der ursprünglichen von Herr und Kollegen publizierten unmodifizierten Methode¹⁸⁰. Einzig die in diesem Paper beschriebene Monoklonalität der T-Zell-Populationen bezüglich des TZR V β -Repertoire konnte nicht auf die in dieser Arbeit generierten T-Zell-Populationen übertragen werden. So erwiesen sich nur zwei der elf untersuchten Populationen als monoklonal (Tab. 3.6). Dies ist möglicherweise durch die zu hohe Anfangszahl an naiven T-Zellen pro Lochvertiefung zu begründen, durch die auch die Anzahl der isolierten allo-HLA-DPB1-reaktiver T-Zellpopulation überdurchschnittlich hoch war. Um die durch diese Arbeit entstandenen allo-HLA-DPB1 Leukämie-reaktiven, CD4 Korezeptor-unabhängigen T-Zell-Populationen, die keine Monoklonalität aufwiesen dennoch für die TZR-Isolation zu nutzen, können Population, die zu einem hohen Prozentsatz die gleiche V β -Kette exprimieren über die durchflusszytometrische Sortierung anhand des V β -Oberflächenmarkers isoliert werden²⁵¹. Auch die Selektion monoklonaler T-Zellen aus diesen T-Zell-Populationen über das sogenannte Grenzverdünnungsverfahren wäre möglich^{252–254}. Um die Effizienz dieser Methode jedoch im Allgemeinen zu verbessern, könnte zum einen die initial eingesetzte T-Zell-Zahl reduziert oder alternativ eine Einzelzellsortierung eingesetzt werden¹⁰⁷.

In Bezug auf die Induktion einer CD4 Korezeptorunabhängigkeit durch die Antikörper-vermittelte CD4-Blockade vor Antigen-spezifischer Stimulation ist eine hohe Effizienz des Versuchsaufbaus zu erkennen. So zeigten in ELISpot Analysen zur Testung der Erkennung allo-HLA-DPB1 präsentierender mDZs unter CD4 blockierenden Bedingungen im Durchschnitt 64% (16 von 25) aller getesteten allo-HLA-DPB1 spezifischen T-Zell-Populationen eine CD4 Korezeptorunabhängigkeit (Abb. 3.25). Diese CD4 Korezeptorunabhängigkeit ließ sich sowohl durch die Erkennung allo-HLA-DPB1-

präsentierender EBV-LCLs sowie AML Blasten im IFN- γ ELISpot, als auch durch das starke Lyseverhalten der T-Zellen, trotz Verwendung des blockierenden Antikörpers während dieser Analysen, für die meisten der getesteten T-Zell-Populationen bestätigen (Tab. 3.6).

Im Gesamten ermöglicht diese einfache, aber effiziente Abwandlung der bereits publizierten Methode die gezielte Isolation von T-Zellen mit der für den funktionellen TZR-Gentransfer wichtigen Funktion der Korezeptorunabhängigkeit. In dieser Arbeit konnte durch Verwendung dieser Methode dennoch nur ein T-Zell-Klon (11G1) isoliert werden, der die gewünschten Eigenschaften der Monoklonalität, der CD4 Korezeptorunabhängigkeit, der allo-HLA-DPB1 Spezifität sowie der Leukämieaktivität miteinander vereint und außerdem noch nicht-hämatopoetische Gewebezellen auch unter inflammatorischen Bedingungen nicht erkennt.

Der beschriebene Ansatz sollte aufgrund seiner Einfachheit in der Ausführung auf andere Antigene übertragbar sein. Auch ein Transfer der Methode zur Isolation HLA-Klasse I erkennender CD8 Korezeptor-unabhängiger T-Zell-Klone sollte unter Verwendung entsprechender Antikörper möglich sein. Des Weiteren ist durch dieses Verfahren nicht nur die Anwendung Korezeptor-abhängiger TZR für den Transfer in α/β T-Zellen durchführbar, sondern auch in γ/δ T-Zellen denkbar. Denn auch γ/δ T-Zellen werden durch ihre Fähigkeit zur Auslösung einer Peptid-spezifischen Lyse und Zytokinfreisetzung *in vitro* sowie einer Peptid-spezifischen Proliferation, Persistenz und Immunantwort *in vivo*, als idealer Kandidat für eine Krebstherapie beschrieben^{255–257}. Aber auch die Gefahr einer Herabsetzung der Oberflächenexpression durch Heterodimerbildung zwischen endogener α - oder β -Kette mit den transgenen Ketten könnte durch die Verwendung von γ/δ T-Zellen umgangen werden²⁵⁶.

5 Zusammenfassung

Für Chemotherapie-refraktäre Leukämiepatienten ist die allo-HSZT aktuell die einzige kurative Therapieform. Dabei vermitteln transferierte Spender-T-Zellen durch die Eradikation residueller Leukämieblasten einen GvL Effekt. Jedoch erkennen diese Lymphozyten häufig auch nicht maligne Zellen und sind somit mit dem Auftreten einer unerwünschten und oft lebensbedrohlichen GvHD assoziiert. Für eine spezifische Anwendung von Spenderlymphozyten nach allogener HSZT wäre es daher erstrebenswert, die unerwünschte GvH- von der gewünschten GvL Reaktivität zu separieren. In den letzten Jahren ist das HLA-Klasse II Molekül HLA-DPB1 als Zielstruktur des GvL Effektes in den Fokus der Wissenschaft gelangt. Klinische Daten zeigten, dass bestimmte permissive HLA-DPB1-Inkompatibilitäten mit einer sinkenden Leukämie rezidivrate ohne ein erhöhtes GvHD Risiko nach allo-HSZT assoziiert sind. HLA-DPB1-spezifische T-Zell-Klone, welche in Vorarbeiten dieser Dissertation durch die Stimulation naïver Spender T-Zellen mit HLA-DPB1 inkompatiblen primären AML Blasten entstanden sind, waren sowohl *in vitro* als auch im humanisierten Tiermodell *in vivo* in der Lage, einen anti-leukämischen antigenspezifischen Effekt zu vermitteln. Da diese Generierung jedoch sehr kosten- sowie zeitintensiv ist und die Funktionalität der T-Zellen durch eine Langzeitkultur sinkt, sollte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Leukämie-reaktiven Eigenschaften der HLA-DPB1 spezifischen T-Zell-Klone 2C4 (HLA-DPB1*14:01-spezifisch), 1F3 (HLA-DPB1*06:01-spezifisch) und 11C12 (HLA-DPB1*04:01-spezifisch) über einen TZR-Gentransfer auf Spender T-Zellen übertragen werden können.

Dafür wurden im ersten Teil dieser Arbeit die Rezeptoren TZR_{DPB1*14:01}, TZR_{DPB1*06:01} und TZR_{DPB1*04:01} aus beschriebenen T-Zell-Klonen isoliert. Durch die Analyse der Expression sowie der funktionellen Eigenschaften bezüglich der Lyse und der Erkennung allo-HLA-DPB1⁺ hämatopoetischer Zellen myeloiden Ursprungs sowie allo-HLA-DPB1⁺ Zellen der lymphoiden Reihe *in vitro* konnte gezeigt werden, dass die allo-HLA-DPB1 restringierte Spezifität der T-Zell-Klone durch den TZR-Transfer in CD4⁺ T-Zellen gesunder Spender übertragbar ist. Ein Transfer dieser Reaktivität auf CD8⁺ Lymphozyten war auf Grund der CD4 Korezeptorabhängigkeit der Rezeptoren TZR_{DPB1*14:01}, TZR_{DPB1*06:01} nur für den CD4 Korezeptor-unabhängigen TZR_{DPB1*04:01} zu zeigen. Durch Einbringung eines zusätzlichen CD4 Moleküls in TZR_{DPB1*06:01} transfizierte CD8⁺ Zellen bzw. durch optimierende Sequenzmodifikationen konnte jedoch die CD4 Korezeptorabhängigkeit dieses Rezeptors ausgeglichen werden. Die Erkennung und Lyse nicht-hämatopoetischer Gewebezellen unter inflammatorischen Bedingungen durch TZR_{DPB1*04:01} transfizierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

zeugt von einem gewissen Potential HLA-DPB1 spezifischer T-Zellen, einen GvHD Effekt zu vermitteln. Die allo-HLA-DPB1 restringierte Leukämieaktivität TZR_{DPB1*04:01} transduzierter CD4⁺ T-Zellen konnte auch *in vivo* anhand der mit AML-Blasten des Patienten UKR167 infiltrierten NSG Mäuse bestätigt werden. Unter genauer Abwägung des Risikopotentials und mittels diverser Möglichkeiten zur Reduktion des Risikos ist die Anwendung des TZR_{DPB1*04:01} als „*off-the-shelf*“ Immuntherapeutikum für AML-Patienten nach allogener HSZT denkbar.

Da die CD4 Korezeptorabhängigkeit die Übertragung der allo-HLA-DPB1 Spezifität in CD8⁺ T-Zellen mittels TZR-Gentransfer beeinträchtigt, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit eine bereits publizierte Methode zur Isolation allo-HLA-DPB1-spezifischer, Leukämie-reaktiver T-Zell-Populationen durch die Verwendung eines CD4 blockierenden Antikörpers zur Etablierung einer CD4 Korezeptorunabhängigkeit modifiziert. So generierte T-Zell-Populationen waren *in vitro* in der Lage, allo-HLA-DPB1-präsentierende, autologe mDZs sowie EBV-LCLs und AML Blasten HLA-DPB1 spezifisch, selbst unter CD4 Korezeptor-blockierenden Bedingungen zu erkennen und zu lysieren. Jedoch konnte eine Monoklonalität der T-Zell-Populationen nur in wenigen Einzelfällen gezeigt werden. Mit leichten Modifikationen, wie der Verwendung einer geringeren T-Zell-Menge zu Beginn der Stimulation, ist dieses Verfahren jedoch eine probate, universelle Methode zur gezielten Isolation von Korezeptor-unabhängigen T-Zellen gegen definierte Antigene.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

1. Murphy KP, Janeway C. Janeway's Immunobiology. 2008.
2. Abbas AK, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Elsevier, Saunders; 2005.
3. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annu. Rev. Immunol.* 1989;7(1):145–173.
4. Sedlacek HH, Möbius A. Immunologie - die Immunabwehr des Menschen: Entstehung, abwehr und Behandlungsmöglichkeiten. 2014.
5. Hirahara K, Nakayama T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int. Immunol.* 2016;28(4):163–171.
6. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today.* 1996;17(3):138–46.
7. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2015;15(5):295–307.
8. Tian T, Yu S, Ma D. Th22 and related cytokines in inflammatory and autoimmune diseases. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2013;17(2):113–125.
9. Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2010;159(2):109–19.
10. Bentley GA, Mariuzza RA. The structure of the T cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 1996;14:563–90.
11. Kunzmann V, Wilhelm M. Anti-lymphoma effect of gammadelta T cells. *Leuk. Lymphoma.* 2005;46(5):671–80.
12. Laydon DJ, Bangham CRM, Asquith B. Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2015;370(1675):.
13. Davis MM. T cell receptor gene diversity and selection. *Annu. Rev. Biochem.* 1990;59:475–96.
14. Owen JJT, Jenkinson EJ, Kingston R, Williams GT, Smith CA. The Role of the Thymus in the Development of T-Cells. *Prog. Immunol.* 1989;215–221.
15. Kropshofer H, Vogt AB, Thery C, et al. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* 1998;17(11):2971–2981.
16. Klein J, Sato A. The HLA System. 2009;
17. Cole DK, Laugel B, Clement M, et al. The molecular determinants of CD8 co-receptor function. *Immunology.* 2012;137(2):139–148.
18. Minguet S, Swamy M, Alarcón B, Luescher IF, Schamel WWA. Full Activation of the T Cell Receptor Requires Both Clustering and Conformational Changes at CD3. *Immunity.* 2007;26(1):43–54.
19. Kane LP, Lin J, Weiss A. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 2000;12(3):242–9.
20. Werlen G, Palmer E. The T-cell receptor signalosome: A dynamic structure with expanding complexity. *Curr. Opin. Immunol.* 2002;14(3):299–305.
21. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2009;27(1):591–619.
22. Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, et al. The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 2001;19(1):375–96.
23. Purbhoo MA, Irvine DJ, Huppa JB, Davis MM. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat. Immunol.* 2004;5(5):524–530.
24. Lee K-H, Holdorf AD, Dustin ML, et al. T Cell Receptor Signaling Precedes Immunological Synapse Formation. *Science (80-).* 2002;295(5559):1539–1542.
25. Kroczyk RA, Mages HW, Hütloff A. Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr. Opin. Immunol.* 2004;16(3):321–327.
26. Alatrash G, Daver N, Mittendorf EA. Targeting Immune Checkpoints in Hematologic Malignancies. *Pharmacol. Rev.* 2016;68(4):1014–1025.
27. Saultz JN, Garzon R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *J. Clin. Med.* 2016;5(3):.
28. Craddock C, Tauro S, Moss P, Grimwade D. Biology and management of relapsed acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2005;129(1):18–34.
29. Schlenk RF, Döhner H. Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* 2013;2013(1):324–30.
30. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet (London, England).* 2006;368(9550):1894–907.
31. Kumar CC. Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia. *Genes Cancer.* 2011;2(2):95–107.
32. Kayser S, Döhner K, Krauter J, et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2,853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood.* 2010;
33. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114(5):937–51.
34. Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia - a review. *Br. J. Haematol.* 2007;140(2):123–132.
35. Liongue C, Ward AC. Granulocyte colony-stimulating factor receptor mutations in myeloid malignancy. *Front. Oncol.* 2014;4:93.
36. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br. J. Haematol.* 1976;33(4):451–458.
37. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391–405.

38. Pulte D, Jansen L, Castro FA, et al. Survival in patients with acute myeloblastic leukemia in Germany and the United States: Major differences in survival in young adults. *Int. J. Cancer*. 2016;139(6):1289–1296.
39. Ferrara F, Palmieri S, Leoni F. Clinically useful prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2008;66(3):181–93.
40. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(12):1136–52.
41. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424–447.
42. Röllig C, Bornhäuser M, Thiede C, et al. Long-Term Prognosis of Acute Myeloid Leukemia According to the New Genetic Risk Classification of the European LeukemiaNet Recommendations: Evaluation of the Proposed Reporting System. *J. Clin. Oncol.* 2011;29(20):2758–2765.
43. Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2012;30(36):4515–23.
44. Löwenberg B. Prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2001;14(1):65–75.
45. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised Recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2016;
46. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N. Engl. J. Med.* 2017;NEJMoA1614359.
47. Godwin CD, Gale RP, Walter RB. Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017;
48. Appelbaum FR. The current status of hematopoietic cell transplantation. *Annu. Rev. Med.* 2003;54:491–512.
49. Tamamyran G, Kadia T, Ravandi F, et al. Frontline treatment of acute myeloid leukemia in adults. *Crit. Rev. Oncol.* 2017;110:20–34.
50. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2009;15(12):1628–33.
51. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 2014;124(3):344–53.
52. Zeng D. Regulators help new immigrants settle down? *Blood*. 2014;123(18):2754–6.
53. Verfaillie CM. Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat. Immunol.* 2002;3(4):314–317.
54. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007;110(13):4576–83.
55. Petersdorf EW. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: histocompatibility. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2007;20(2):155–70.
56. Begovich AB, McClure GR, Suraj VC, et al. Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J. Immunol.* 1992;148(1):249–58.
57. Price P, Witt C, Allcock R, et al. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol. Rev.* 1999;167:257–74.
58. Pedron B, Duval M, Elbou OM, et al. Common genomic HLA haplotypes contributing to successful donor search in unrelated hematopoietic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31(6):423–427.
59. Tiercy J-M. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica*. 2016;101(6):680–7.
60. Nowak J. Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42 Suppl 2(S2):S71-6.
61. Kolb H-J, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood*. 2004;103(3):767–76.
62. Pavletic SZ, Fowler DH. GVHD - Are we making progress in GVHD prophylaxis and treatment? *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2012;2012:251–64.
63. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat. Rev. Cancer*. 2004;4(5):371–80.
64. Kolb H-J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008;112(12):4371–83.
65. Harris AC, Ferrara JLM, Levine JE. Advances in predicting acute GVHD. *Br. J. Haematol.* 2013;160(3):288–302.
66. Jenq RR, van den Brink MRM. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2010;10(3):213–21.
67. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J. Rare Dis.* 2007;2(1):35.
68. Reddy P, Arora M, Guimond M, Mackall CL. GVHD: A Continuing Barrier to the Safety of Allogeneic Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2009;15(1):162–168.
69. Harris AC, Levine JE, Ferrara JLM. Have we made progress in the treatment of GVHD? *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2012;25(4):473–478.
70. Gyurkocza B, Storb R, Storer BE, et al. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2010;28(17):2859–67.
71. Leung AYH, Kwong Y-L. Haematopoietic stem cell transplantation: current concepts and novel therapeutic strategies. *Br. Med. Bull.* 2010;93:85–103.
72. Hobbs GS, Perales M-A. Effects of T-Cell Depletion on Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcomes in AML Patients. *J. Clin. Med.* 2015;4(3):488–503.
73. Teschner D, Distler E, Wehler D, et al. Depletion of naive T cells using clinical grade magnetic CD45RA beads: a new approach for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(1):138–44.
74. Meyer RG, Britten CM, Wehler D, et al. Prophylactic transfer of CD8-depleted donor lymphocytes after T-cell-depleted reduced-intensity transplantation. *Blood*. 2007;109(1):374–82.
75. Hofmann S, Greiner J. Adoptive Immunotherapy after Allogeneic Hematopoietic Progenitor Cell Transplantation: New Perspectives for Transfusion Medicine. *Transfus. Med. Hemother.* 2011;38(3):173–182.

76. Ho VT, Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2001;98(12):3192–204.
77. Kolb H, Mittermüller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990;76(12):.
78. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*. 1998;91(3):756–63.
79. Frey N V, Porter DL. Graft-versus-host disease after donor leukocyte infusions: presentation and management. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2008;21(2):205–22.
80. Stevanović S, Griffioen M, Nijmeijer B a, et al. Human allo-reactive CD4+ T cells as strong mediators of anti-tumor immunity in NOD/scid mice engrafted with human acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(2):312–22.
81. Falkenburg JHF, Warren EH. Graft versus leukemia reactivity after allogeneic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2011;17(1 Suppl):S33-8.
82. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood*. 2007;109(12):5346–5354.
83. Zhong R-K, Lane TA, Ball ED. Generation of T-cell lines to autologous acute myeloid leukemia cells by competitive limiting dilution culture of acute myeloid leukemia mononuclear cells. *Exp. Hematol.* 2008;36(4):486–94.
84. Thomas-Kaskel A-K, Portugal TGA, Herchenbach D, et al. Allogeneic HLA-matched donor dendritic cells loaded with patient leukemic blasts preferentially induce CD4-positive leukemia-reactive donor lymphocytes. *Acta Haematol.* 2007;117(4):226–35.
85. Barrett AJ. Mechanisms of the graft-versus-leukemia reaction. *Stem Cells*. 1997;15(4):248–58.
86. Ball LM, Egeler RM. Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:S58–S64.
87. Champlin R, Giralt S, Przepiorka D, et al. Selective depletion of CD8-positive T-lymphocytes for allogeneic bone marrow transplantation: Engraftment, graft-versus- host disease and graft-versus leukemia. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1992;377:385–398.
88. Giralt S, Hester J, Huh Y, et al. CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1995;86(11):4337–43.
89. Baron F, Baudoux E, Frère P, et al. Nonmyeloablative Stem Cell Transplantation with CD8-Depleted or CD34-Selected Peripheral Blood Stem Cells. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2002;11(2):301–314.
90. Chapuis AG, Ragnarsson GB, Nguyen HN, et al. Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci. Transl. Med.* 2013;5(174):174ra27.
91. Collins T, Korman AJ, Wake CT, et al. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1984;81(15):4917–21.
92. Molldrem J, Dermime S, Parker K, et al. Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells. *Blood*. 1996;88(7):2450–7.
93. Rosenfeld C, Cheever MA, Gaiger A. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia*. 2003;17(7):1301–12.
94. Greiner J, Döhner H, Schmitt M. Cancer vaccines for patients with acute myeloid leukemia--definition of leukemia-associated antigens and current clinical protocols targeting these antigens. *Haematologica*. 2006;91(12):1653–61.
95. Anguille S, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Leukemia-associated antigens and their relevance to the immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012;26(10):2186–2196.
96. Graf C, Heidel F, Tenzer S, et al. A neoepitope generated by an FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8+ T cells. *Blood*. 2007;109(7):2985–8.
97. Rezvani K, Grube M, Brenchley JM, et al. Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8+ T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation. *Blood*. 2003;102(8):2892–900.
98. Goulmy E. Minor Histocompatibility Antigens: from Transplantation Problems to Therapy of Cancer. *Hum. Immunol.* 2006;67(6):433–438.
99. Meij P, Jedema I, van der Hoorn MAWG, et al. Generation and administration of HA-1-specific T-cell lines for the treatment of patients with relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation: a pilot study. *Haematologica*. 2012;97(8):1205–1208.
100. Loiseau P, Busson M, Balere M-L, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2007;13(8):965–74.
101. Tiercy J-M, Marsh SGE, Schreuder GMT, et al. Guidelines for nomenclature usage in HLA reports: ambiguities and conversion to serotypes. *Eur. J. Immunogenet.* 2002;29(3):273–274.
102. Fürst D, Müller C, Vucinic V, et al. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood*. 2013;122(18):3220–9.
103. Shaw BE, Mayor NP, Russell NH, et al. Diverging effects of HLA-DPB1 matching status on outcome following unrelated donor transplantation depending on disease stage and the degree of matching for other HLA alleles. *Leukemia*. 2010;24(1):58–65.
104. Hollenbach JA, Madbouly A, Gragert L, et al. A combined DPA1-DPB1 amino acid epitope is the primary unit of selection on the HLA-DP heterodimer. *Immunogenetics*. 2012;64(8):559–569.
105. BAISCH JM, CAPRA JD. Linkage Disequilibrium within the HLA Complex does not extend into HLA-DP. *Scand. J. Immunol.* 1993;37(4):499–503.
106. Begovich AB, Moonsamy P V, Mack SJ, et al. Genetic variability and linkage disequilibrium within the HLA-DP region: analysis of 15 different populations. *Tissue Antigens*. 2001;57(5):424–39.

107. Stevanovic S, van Bergen CAM, van Luxemburg-Heijs SAP, et al. HLA class II upregulation during viral infection leads to HLA-DP-directed graft-versus-host disease after CD4⁺ donor lymphocyte infusion. *Blood*. 2013;122(11):1963–73.
108. Crocchiolo R, Zino E, Vago L, et al. Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009;114(7):1437–44.
109. Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T, et al. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *Lancet. Oncol.* 2012;13(4):366–74.
110. Shaw BE, Nolan A. Allogeneic transplantation: when is a mismatch better than a match? *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2013;19(1):1–2.
111. Ibisch C, Gallot G, Vivien R, et al. Recognition of leukemic blasts by HLA-DPB1-specific cytotoxic T cell clones: a perspective for adjuvant immunotherapy post-bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23(11):1153–9.
112. Shaw BE, Gooley TA, Malkki M, et al. The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2007;110(13):4560–4566.
113. Zino E, Vago L, Di Terlizzi S, et al. Frequency and targeted detection of HLA-DPB1 T cell epitope disparities relevant in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2007;13(9):1031–40.
114. Shaw BE, Robinson J, Fleischhauer K, Madrigal JA, Marsh SGE. Translating the HLA-DPB1 T-cell epitope-matching algorithm into clinical practice. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(12):1510–2.
115. Rutten CE, Luxemburg-heijs SAP Van, Griffioen M, et al. HLA-DP as specific target for cellular immunotherapy in HLA class II-expressing B-cell leukemia. *Leukemia*. 2008;1387–1394.
116. Fleischhauer K, Fernandez-Viña MA, Wang T, et al. Risk associations between HLA-DPB1 T-cell epitope matching and outcome of unrelated hematopoietic cell transplantation are independent of HLA-DPA1. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(9):1176–83.
117. Petersdorf EW, Malkki M, O'hUigin C, et al. High HLA-DP Expression and Graft-versus-Host Disease. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(7):599–609.
118. Garber HR, Mirza A, Mittendorf EA, Alatrash G. Adoptive T-cell therapy for Leukemia. *Mol. Cell. Ther.* 2014;2:25.
119. Amrolia PJ, Reid SD, Gao L, et al. Allorestricted cytotoxic T cells specific for human CD45 show potent antileukemic activity. *Blood*. 2003;101(3):1007–14.
120. Albrecht J, Frey M, Teschner D, et al. IL-21-treated naïve CD45RA⁺ CD8⁺ T cells represent a reliable source for producing leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes with high proliferative potential and early differentiation phenotype. *Cancer Immunol. Immunother.* 2011;60(2):235–248.
121. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. Sorting through subsets: which T-cell populations mediate highly effective adoptive immunotherapy? *J. Immunother.* 2012;35(9):651–60.
122. Pawelec G, Wagner W, Adibzadeh M, Engel A. T cell immunosenescence in vitro and in vivo. *Exp. Gerontol.* 1999;34(3):419–429.
123. Johnson LA, June CH. Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer. *Cell Res.* 2017;27(1):38–58.
124. Dembić Z, Haas W, Weiss S, et al. Transfer of specificity by murine α and β T-cell receptor genes. *Nature*. 1986;320(6059):232–238.
125. Clay TM, Custer MC, Sachs J, et al. Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J. Immunol.* 1999;163(1):507–13.
126. Kessels HW, Wolkers MC, van den Boom MD, van der Valk MA, Schumacher TN. Immunotherapy through TCR gene transfer. *Nat. Immunol.* 2001;2(10):957–61.
127. Xue S-A, Gao L, Thomas S, et al. Development of a Wilms' tumor antigen-specific T-cell receptor for clinical trials: engineered patient's T cells can eliminate autologous leukemia blasts in NOD/SCID mice. *Haematologica*. 2010;95(1):126–34.
128. Voss R-H, Kuball J, Theobald M. Designing TCR for cancer immunotherapy. *Methods Mol. Med.* 2005;109(4):229–56.
129. Engels B, Cam H, Schüler T, et al. Retroviral Vectors for High-Level Transgene Expression in T Lymphocytes. *Hum. Gene Ther.* 2003;14(12):1155–1168.
130. Miller AD. Retrovirus Packaging Cells. *Hum. Gene Ther.* 1990;1(1):5–14.
131. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 2008;118(9):3132–42.
132. Baum C, Kustikova O, Modlich U, Li Z, Fehse B. Mutagenesis and Oncogenesis by Chromosomal Insertion of Gene Transfer Vectors. *Hum. Gene Ther.* 2006;17(3):253–263.
133. Bendle GM, Linnemann C, Hooijkaas AI, et al. Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat. Med.* 2010;16(5):565–70, 1p following 570.
134. Voss R-H, Thomas S, Pfirschke C, et al. Coexpression of the T-cell receptor constant alpha domain triggers tumor reactivity of single-chain TCR-transduced human T cells. *Blood*. 2010;115(25):5154–63.
135. Thomas S, Klobuch S, Besold K, et al. Strong and sustained effector function of memory- versus naïve-derived T cells upon T-cell receptor RNA transfer: implications for cellular therapy. *Eur. J. Immunol.* 2012;42(12):3442–53.
136. Birkholz K, Hofmann C, Hoyer S, et al. A fast and robust method to clone and functionally validate T-cell receptors. *J. Immunol. Methods*. 2009;346(1–2):45–54.
137. Schaft N, Dörrie J, Müller I, et al. A new way to generate cytolytic tumor-specific T cells: electroporation of RNA coding for a T cell receptor into T lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 2006;55(9):1132–41.
138. Barrett DM, Liu X, Jiang S, et al. Regimen-Specific Effects of RNA-Modified Chimeric Antigen Receptor T Cells in Mice with Advanced Leukemia. *Hum. Gene Ther.* 2013;24(8):717–727.
139. Falkenburg JHF, Jedema I. Allo-reactive T cells for the treatment of hematological malignancies. *Mol. Oncol.* 2015;9(10):1894–903.
140. Pachnio A, Dietrich S, Klapper W, et al. Proliferation-based T-cell selection for immunotherapy and graft-versus-

- host-disease prophylaxis in the context of bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006;38(2):157–167.
141. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science.* 2006;314(5796):126–9.
 142. Uttenhuth BJ, Chua I, Morris EC, Stauss HJ. Challenges in T cell receptor gene therapy. *J. Gene Med.* 2012;14(6):386–99.
 143. Scholten KBJ, Kramer D, Kueter EWM, et al. Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells. *Clin. Immunol.* 2006;119(2):135–145.
 144. Sommermeyer D, Uckert W. Minimal amino acid exchange in human TCR constant regions fosters improved function of TCR gene-modified T cells. *J. Immunol.* 2010;184(11):6223–31.
 145. Cohen CJ, Li YF, El-Gamil M, et al. Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond. *Cancer Res.* 2007;67(8):3898–903.
 146. Kuball J, Dossett ML, Wolfl M, et al. Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells. *Blood.* 2007;109(6):2331–8.
 147. Li ZG, Wu WP, Manolios N. Structural mutations in the constant region of the T-cell antigen receptor (TCR)beta chain and their effect on TCR alpha and beta chain interaction. *Immunology.* 1996;88(4):524–30.
 148. Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, et al. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell.* 1994;76(4):651–663.
 149. Sadovnikova E, Jopling LA, Soo KS, Stauss HJ. Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 1998;28(1):193–200.
 150. Kuball J, Schmitz FW, Voss R-H, et al. Cooperation of human tumor-reactive CD4+ and CD8+ T cells after redirection of their specificity by a high-affinity p53A2.1-specific TCR. *Immunity.* 2005;22(1):117–29.
 151. Theobald M, Biggs J, Dittmer D, Levine AJ, Sherman LA. Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995;92(26):11993–7.
 152. Zhao Y, Bennett AD, Zheng Z, et al. High-affinity TCRs generated by phage display provide CD4+ T cells with the ability to recognize and kill tumor cell lines. *J. Immunol.* 2007;179(9):5845–54.
 153. Daniels MA, Hogquist KA, Jameson SC. Sweet “n” sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat. Immunol.* 2002;3(10):903–10.
 154. Kuball J, Hauptrock B, Malina V, et al. Increasing functional avidity of TCR-redirectioned T cells by removing defined N-glycosylation sites in the TCR constant domain. *J. Exp. Med.* 2009;206(2):463–75.
 155. Lampson LA, Levy R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J. Immunol.* 1980;125(1):293–9.
 156. Watson AJ, DeMars R, Trowbridge IS, Bach FH. Detection of a novel human class II HLA antigen. *Nature.* 304(5924):358–61.
 157. Spits H, Keizer G, Borst J, et al. Characterization of monoclonal antibodies against cell surface molecules associated with cytotoxic activity of natural and activated killer cells and cloned CTL lines. *Hybridoma.* 1983;2(4):423–37.
 158. Parham P, Barnstable CJ, Bodmer WF. Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C, antigens. *J. Immunol.* 1979;123(1):342–9.
 159. Schaft N, Dörrie J, Thumann P, et al. Generation of an Optimized Polyvalent Monocyte-Derived Dendritic Cell Vaccine by Transfecting Defined RNAs after Rather Than before Maturation. *J. Immunol.* 2005;174(5):.
 160. Minskaia E, Nicholson J, Ryan MD. Optimisation of the foot-and-mouth disease virus 2A co-expression system for biomedical applications. *BMC Biotechnol.* 2013;13(1):67.
 161. Minskaia E, Ryan MD. Protein coexpression using FMDV 2A: effect of “linker” residues. *Biomed Res. Int.* 2013;2013:291730.
 162. Bimboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7(6):1513–1523.
 163. Heemskerk MHM, Hoogeboom M, de Paus RA, et al. Redirection of antileukemic reactivity of peripheral T lymphocytes using gene transfer of minor histocompatibility antigen HA-2-specific T-cell receptor complexes expressing a conserved alpha joining region. *Blood.* 2003;102(10):.
 164. Salter RD, Howell DN, Cresswell P. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics.* 1985;21(3):235–46.
 165. Tatsumi E. Epstein-Barr virus (EBV) and human hematopoietic cell lines: a review. *Hum. Cell.* 1992;5(1):79–86.
 166. Dauer M, Obermaier B, Herten J, et al. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J. Immunol.* 2003;170(8):4069–76.
 167. Jonuleit H, Kühn U, Müller G, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* 1997;27(12):3135–3142.
 168. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.* 1990;11(2):231–238.
 169. Swift S, Lorens J, Achacoso P, Nolan GP. Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr. Protoc. Immunol.* 2001;Chapter 10:Unit 10.17C.
 170. Pear WS, Scott ML, Nolan GP. Generation of High-Titer, Helper-Free Retroviruses by Transient Transfection. *Gene Ther. Protoc.* 1997;7:41–58.
 171. Swift S, Lorens J, Achacoso P, et al. Rapid Production of Retroviruses for Efficient Gene Delivery to Mammalian Cells Using 293T Cell-Based Systems. *Curr. Protoc. Immunol.* 2001;10.17.14-10.17.29.
 172. Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys. Chem.* 2002;97(2–3):159–72.
 173. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods.* 1983;65(1–2):109–21.
 174. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2R null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells. *J. Immunol.* 2005;174(10):6477–6489.

175. Agliano A, Martin-Padura I, Mancuso P, et al. Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2R γ null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *Int. J. Cancer*. 2008;123(9):2222–2227.
176. Sanchez P V, Perry RL, Sarry JE, et al. A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009;23(11):2109–17.
177. Greiner DL, Hesselton RA, Shultz LD. SCID Mouse Models of Human Stem Cell Engraftment. *Stem Cells*. 1998;16(3):166–177.
178. Qing Y, Lin Y, Gerson SL. An intrinsic BM hematopoietic niche occupancy defect of HSC in scid mice facilitates exogenous HSC engraftment. *Blood*. 2012;119(7):1768–71.
179. Brehm MA, Racki WJ, Leif J, et al. Engraftment of human HSCs in nonirradiated newborn NOD-scid IL2r γ null mice is enhanced by transgenic expression of membrane-bound human SCF. *Blood*. 2012;119(12):2778–88.
180. Herr W, Eichinger Y, Beshay J, et al. HLA-DPB1 mismatch alleles represent powerful leukemia rejection antigens in CD4 T-cell immunotherapy after allogeneic stem-cell transplantation. *Leukemia*. 2017;31(2):434–445.
181. Eichinger Y. Generation and characterisation of acute myeloid leukaemia-reactive CD4 + T cells and their potential to eliminate human leukaemia blasts in NSG mice. *Doktorarbeit*. 2014;
182. Brochet X, Lefranc M-P, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Web Server issue):W503–8.
183. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics*. 1995;42(6):455–500.
184. Birkholz K, Hombach A, Krug C, et al. Transfer of mRNA encoding recombinant immunoreceptors reprograms CD4+ and CD8+ T cells for use in the adoptive immunotherapy of cancer. *Gene Ther*. 2009;16(5):596–604.
185. Tan MP, Dolton GM, Gerry AB, et al. Human leucocyte antigen class I-redirected anti-tumour CD4(+) T cells require a higher T cell receptor binding affinity for optimal activity than CD8(+) T cells. *Clin. Exp. Immunol*. 2017;187(1):124–137.
186. Stone JD, Chervin AS, Kranz DM. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology*. 2009;126(2):165–76.
187. Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger J-M. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat. Rev. Immunol. Publ. online 01 Oct. 2005*; | doi10.1038/nri1708. 2005;5(10):793.
188. Zhou F. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int. Rev. Immunol*. 2009;28(November):239–260.
189. Geppert TD, Lipsky PE. Antigen presentation by interferon-gamma-treated endothelial cells and fibroblasts: differential ability to function as antigen-presenting cells despite comparable Ia expression. *J. Immunol*. 1985;135(6):3750–62.
190. Slavin S. Allogeneic cell-mediated immunotherapy at the stage of minimal residual disease following high-dose chemotherapy supported by autologous stem cell transplantation. *Acta Haematol*. 2005;114(4):214–20.
191. Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, et al. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single “self-cleaving” 2A peptide-based retroviral vector. *Nat. Biotechnol*. 2004;22(5):589–94.
192. Hinrichs CS, Borman ZA, Gattinoni L, et al. Human effector CD8+ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood*. 2011;117(3):808–14.
193. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol*. 2002;3(11):999–1005.
194. van Luijn MM, Chamuleau MED, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Marieke van Ham S. Tumor immune escape in acute myeloid leukemia: Class II-associated invariant chain peptide expression as result of deficient antigen presentation. *Oncoimmunology*. 2012;1(2):211–213.
195. Falkenburg JHF, Heslop HE, Barrett AJ. T Cell Therapy in Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2008;14(1):136–141.
196. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550–1561.
197. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*. 2009;114(3):535–46.
198. Schmitt TM, Stromnes IM, Chapuis AG, Greenberg PD. New Strategies in Engineering T-cell Receptor Gene-Modified T cells to More Effectively Target Malignancies. *Clin. Cancer Res*. 2015;21(23):.
199. Stauss HJ, Cesco-Gaspere M, Thomas S, et al. Monoclonal T-cell receptors: new reagents for cancer therapy. *Mol. Ther*. 2007;15(10):1744–50.
200. Heemskerk MHM. T-cell receptor gene transfer for the treatment of leukemia and other tumors. *Haematologica*. 2010;95(1):15–9.
201. Heemskerk MHM, Hagedoorn RS, van der Hoorn MAWG, et al. Efficiency of T-cell receptor expression in dual-specific T cells is controlled by the intrinsic qualities of the TCR chains within the TCR-CD3 complex. *Blood*. 2007;109(1):235–43.
202. Blumberg RS, Alarcon B, Sancho J, et al. Assembly and function of the T cell antigen receptor. Requirement of either the lysine or arginine residues in the transmembrane region of the alpha chain. *J. Biol. Chem*. 1990;265(23):14036–43.
203. Zhao Y, Zheng Z, Cohen CJ, et al. High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Mol. Ther*. 2006;13(1):151–9.
204. Cohen CJ, Zhao Y, Zheng Z, Rosenberg SA, Morgan RA. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res*. 2006;66(17):8878–8886.
205. Sommermeyer D, Neudorfer J, Weinhold M, et al. Designer T cells by T cell receptor replacement. *Eur. J. Immunol*. 2006;36(11):3052–9.
206. Thomas S, Stauss HJ, Morris EC. Molecular immunology lessons from therapeutic T-cell receptor gene transfer.

- Immunology*. 2010;129(2):170–7.
207. Willemsen R, Ronteltap C, Heuveling M, Debets R, Bolhuis R. Redirecting human CD4+ T lymphocytes to the MHC class I-restricted melanoma antigen MAGE-A1 by TCR alphabeta gene transfer requires CD8alpha. *Gene Ther*. 2005;12(2):140–6.
 208. Fleischhauer K. Immunogenetics of HLA-DP--A New View of Permissible Mismatches. *N. Engl. J. Med*. 2015;373(7):669–72.
 209. Isidori A, Loscocco F, Ciciarello M, et al. Renewing the immunological approach to AML treatment: from novel pathways to innovative therapies. *Cancer Res. Front*. 2016;2(2):226–251.
 210. Teague RM, Kline J. Immune evasion in acute myeloid leukemia: current concepts and future directions. *J. Immunother. cancer*. 2013;1(13):13.
 211. Curti A, Aluigi M, Pandolfi S, et al. Acute myeloid leukemia cells constitutively express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia*. 2007;21(2):353–355.
 212. Shih K, Arkenau H-T, Infante JR. Clinical impact of checkpoint inhibitors as novel cancer therapies. *Drugs*. 2014;74(17):1993–2013.
 213. Bachmann MF, Oxenius A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep*. 2007;8(12):1142–8.
 214. Lo KM, Sudo Y, Chen J, et al. High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Eng*. 1998;11(6):495–500.
 215. Martin CE, van Leeuwen EMM, Im SJ, et al. IL-7/anti-IL-7 mAb complexes augment cytokine potency in mice through association with IgG-Fc and by competition with IL-7R. *Blood*. 2013;121(22):4484–4492.
 216. Vago L, Perna SK, Zanussi M, et al. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med*. 2009;361(5):478–488.
 217. del Campo AB, Carretero J, Aptsiauri N, Garrido F. Targeting HLA class I expression to increase tumor immunogenicity. *Tissue Antigens*. 2012;79(3):147–154.
 218. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoevasion. *Nature*. 2012;482(7385):400–4.
 219. Sehgal A, Whiteside TL, Boyiadzis M. Programmed death-1 checkpoint blockade in acute myeloid leukemia. *Expert Opin. Biol. Ther*. 2015;15(8):1191–203.
 220. Shi L, Chen S, Yang L, Li Y. The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol*. 2013;6(1):74.
 221. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol*. 1996;8(5):765–772.
 222. Parry R V, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell. Biol*. 2005;25(21):9543–53.
 223. Schmohl JU, Nuebling T, Wild J, et al. Expression of RANK-L and in part of PD-1 on blasts in patients with acute myeloid leukemia correlates with prognosis. *Eur. J. Haematol*. 2016;97(6):517–527.
 224. Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families. *Immunol. Res*. 1999;19(1):1–24.
 225. Maeda A, Yamamoto K, Yamashita K, et al. The expression of co-stimulatory molecules and their relationship to the prognosis of human acute myeloid leukaemia: poor prognosis of B7-2-positive leukaemia. *Br. J. Haematol*. 1998;102(5):1257–1262.
 226. Austin R, Smyth MJ, Lane SW. Harnessing the immune system in acute myeloid leukaemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2016;103:62–77.
 227. Modlich U, Baum C. Preventing and exploiting the oncogenic potential of integrating gene vectors. *J. Clin. Invest*. 2009;119(4):755–8.
 228. Baum C, Düllmann J, Li Z, et al. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003;101(6):2099–2114.
 229. Scholler J, Brady TL, Binder-Scholl G, et al. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci. Transl. Med*. 2012;4(132):132ra53.
 230. Jones BS, Lamb LS, Goldman F, Di Stasi A. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front. Pharmacol*. 2014;5:254.
 231. Zhang E, Xu H. A new insight in chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy. *J. Hematol. Oncol*. 2017;10(1):1.
 232. Zhou X, Brenner MK. Improving the safety of T-Cell therapies using an inducible caspase-9 gene. *Exp. Hematol*. 2016;44(11):1013–1019.
 233. Wang X, Chang W-C, Wong CW, et al. A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood*. 2011;118(5):1255–63.
 234. Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N. Engl. J. Med*. 2011;365(18):1673–83.
 235. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science*. 1997;276(5319):1719–24.
 236. Bonini C, Bondanza A, Perna SK, et al. The suicide gene therapy challenge: how to improve a successful gene therapy approach. *Mol. Ther*. 2007;15(7):1248–52.
 237. Ngo MC, Rooney CM, Howard JM, Heslop HE. Ex vivo gene transfer for improved adoptive immunotherapy of cancer. *Hum. Mol. Genet*. 2011;20(R1):R93–9.
 238. Wu C-Y, Roybal KT, Puchner EM, Onuffer J, Lim WA. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science*. 2015;350(6258):aab4077.
 239. Roybal KT, Rupp LJ, Morsut L, et al. Precision Tumor Recognition by T Cells with Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell*. 2016;164(4):770–779.
 240. Distler E, Bloetz A, Albrecht J, et al. Alloreactive and leukemia-reactive T cells are preferentially derived from naïve

- precursors in healthy donors: Implications for immunotherapy with memory T cells. *Haematologica*. 2011;96(7):1024–1032.
241. Davis JL, Theoret MR, Zheng Z, et al. Development of human anti-murine T-cell receptor antibodies in both responding and nonresponding patients enrolled in TCR gene therapy trials. *Clin. Cancer Res.* 2010;16(23):5852–61.
 242. Bialer G, Horovitz-Fried M, Ya'acobi S, Morgan RA, Cohen CJ. Selected murine residues endow human TCR with enhanced tumor recognition. *J. Immunol.* 2010;184(11):6232–41.
 243. Moeller M, Kershaw MH, Cameron R, et al. Sustained Antigen-Specific Antitumor Recall Response Mediated by Gene-Modified CD4+ T Helper-1 and CD8+ T Cells. *Cancer Res.* 2007;67(23):11428–11437.
 244. Moeller M, Haynes NM, Kershaw MH, et al. Adoptive transfer of gene-engineered CD4+ helper T cells induces potent primary and secondary tumor rejection. *Blood*. 2005;106(9):2995–3003.
 245. Shedlock DJ. Requirement for CD4 T Cell Help in Generating Functional CD8 T Cell Memory. *Science (80-)*. 2003;300(5617):337–339.
 246. Morgan RA, Dudley ME, Yu YYL, et al. High efficiency TCR gene transfer into primary human lymphocytes affords avid recognition of melanoma tumor antigen glycoprotein 100 and does not alter the recognition of autologous melanoma antigens. *J. Immunol.* 2003;171(6):3287–95.
 247. Morris EC, Tsallios A, Bendle GM, Xue S-A, Stauss HJ. A critical role of T cell antigen receptor-transduced MHC class I-restricted helper T cells in tumor protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102(22):7934–9.
 248. Moore T V, Lyons GE, Brasic N, et al. Relationship between CD8-dependent antigen recognition, T cell functional avidity, and tumor cell recognition. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009;58(5):719–28.
 249. Distler E, Wölfel C, Köhler S, et al. Acute myeloid leukemia (AML)-reactive cytotoxic T lymphocyte clones rapidly expanded from CD8+ CD62L(high)+ T cells of healthy donors prevent AML engraftment in NOD/SCID IL2R γ null mice. *Exp. Hematol.* 2008;36(4):451–463.
 250. Nagy ZA. Alloreactivity: an old puzzle revisited. *Scand. J. Immunol.* 2012;75(5):463–70.
 251. Sant'Angelo DB, Cresswell P, Janeway CA, Denzin LK. Maintenance of TCR clonality in T cells expressing genes for two TCR heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98(12):6824–9.
 252. Chen WF, Wilson A, Scollay R, Shortman K. Limit-dilution assay and clonal expansion of all T cells capable of proliferation. *J. Immunol. Methods*. 1982;52(3):307–22.
 253. Carneiro J, Duarte L, Padovan E. Limiting dilution analysis of antigen-specific T cells. *Methods Mol Biol.* 2009;514:95–105.
 254. Dorrschuck A, Schmidt A, Schnürer E, et al. CD8+ cytotoxic T lymphocytes isolated from allogeneic healthy donors recognize HLA class Ia/Ib-associated renal carcinoma antigens with ubiquitous or restricted tissue expression. *Blood*. 2004;104(8):2591–2599.
 255. Hiasa A, Nishikawa H, Hirayama M, et al. Rapid alphabeta TCR-mediated responses in gammadelta T cells transduced with cancer-specific TCR genes. *Gene Ther.* 2009;16(5):620–628.
 256. van der Veken LT, Coccoris M, Swart E, et al. Alpha beta T cell receptor transfer to gamma delta T cells generates functional effector cells without mixed TCR dimers in vivo. *J. Immunol.* 2009;182(1):164–70.
 257. van der Veken LT, Hagedoorn RS, Van Loenen MM, et al. Alpha beta T-cell receptor engineered gamma delta T cells mediate effective antileukemic reactivity. *Cancer Res.* 2006;66(6):3331–3337.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.: Aufbau eines T-Zell-Rezeptors mit zugehörigem Genlokus.....	4
Abb. 1.2.: Aufbau des HLA-Genlokus sowie schematische Darstellung der HLA-Moleküle.....	6
Abb. 1.3.: Abfolge der intrazellulären Signalübertragungskaskade bei T-Zell-Aktivierung	8
Abb. 1.4.: T-Zellen als Effektoren des GvL Effektes und der GvH Erkrankung.....	15
Abb. 1.5.: HLA-DPB1 und -DPA1 Allel Frequenzen in der kaukasischen Bevölkerung.....	18
Abb. 1.6.: Die adoptive TZR-Therapie im Überblick.....	21
Abb. 2.1.: Strategie zur Isolation und Amplifikation der Gene am Beispiel der TZR α -Kette	39
Abb. 2.2.: Schematische Darstellung der in vivo Testung.....	59
Abb. 3.1.: Expression der allo-HLA-DPB1-reaktiven TZR in der T-Zelllinie Jurkat76.....	63
Abb. 3.2.: Expression der allo-HLA-DPB1-reaktiven TZR in humanen CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	64
Abb. 3.3.: Expressionskinetik des TZR _{DPB1*14:01} auf humanen CD4 ⁺ T-Zellen	65
Abb. 3.4.: Funktionelle Testung TZR-RNA transfizierter T-Zellen gegen EBV-LCLs	67
Abb. 3.5.: HLA-DP-spezifische Erkennung allo-HLA-DPB1*04:01 ⁺ EBV-LCL-MZ683 durch TZR _{DPB1*04:01} transfizierte CD4 ⁺ T-Zellen	68
Abb. 3.6.: CD4 Korezeptorabhängigkeit des TZR _{DPB1*06:01}	69
Abb. 3.7.: Analyse der CD4 Korezeptorabhängigkeit des TZR _{DPB1*06:01}	70
Abb. 3.8.: IFN- γ Freisetzung von TZR _{DPB1*06:01} transfizierten T-Zellen nach TZR-Optimierung	72
Abb. 3.9.: Zytotoxizität von TZR _{DPB1*06:01} transfizierten CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen im ⁵¹ Chrom-Freisetzungstest	73
Abb. 3.10.: CD4 Korezeptorabhängigkeit des TZR _{DPB1*04:01}	74
Abb. 3.11.: Analyse der TZR V β 13.2 Oberflächenexpression auf CD4 ⁺ T-Zellen	75
Abb. 3.12.: IFN- γ Freisetzung von TZR _{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen nach TZR-Optimierung	76
Abb. 3.13.: Analyse der HLA-DP Oberflächenexpression auf AML-Blasten.....	77
Abb. 3.14.: HLA-DP-spezifische Erkennung von Leukämieblasten	78

Abb. 3.15.: Analyse der HLA-DP Oberflächenexpression auf Fibroblasten	80
Abb. 3.16.: Spezifische Erkennung von Gewebezellen durch TZR _{DPB1*04:01} transfizierte T-Zellen.....	81
Abb. 3.17.: Expression stabil transduzierter TZR in humanen CD4 ⁺ T-Zellen	83
Abb. 3.18.: Funktionelle Charakterisierung TZR transduzierter T-Zellen.....	84
Abb. 3.19.: <i>In vivo</i> Wirksamkeit der TZR _{DPB1*04:01} transduzierten CD4 ⁺ T-Zellen gegen die AML Blasten des Patienten UKR121	85
Abb. 3.20.: Oberflächenexpression verschiedener immunregulatorischer Moleküle	86
Abb. 3.21.: <i>In vivo</i> Wirksamkeit der TZR _{DPB1*04:01} transduzierten T-Zellen gegen die AML Blasten des Patienten UKR167.....	86
Abb. 3.22.: Schema der Generierung von allo-HLA-DPB1-spezifischen, CD4 Korezeptor-unabhängigen, CD4 ⁺ T-Zell-Klonen.....	88
Abb. 3.23.: Erkennung allo-HLA-DPB1 auf autologen mDZs durch generierte T-Zell-Populationen.....	89
Abb. 3.24.: CD4 ⁺ T-Zell-Populationen 11E2 und 11G1 vermitteln allo-HLA-DPB1-spezifische Erkennung und Lyse von AML Blasten und EBV-LCLs	90
Abb. 3.25.: CD4 Korezeptorunabhängigkeit von allo-HLA-DPB1-spezifischen CD4 ⁺ T-Zell-Populationen	91
Abb. 3.26.: CD4 Korezeptorunabhängigkeit von allo-HLA-DPB1-spezifischen, Leukämie-reaktiven CD4 ⁺ T-Zell-Populationen.....	92
Abb. 3.27.: Untersuchung der Erkennung von Fibroblasten durch die allo-HLA-DPB1*03:01 spezifischen CD4 ⁺ T-Zell-Populationen 11E2 und 11G1	93

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1.: Molekular- und zytogenetische Risikogruppen der AML gemäß des EuropeanLeukemiaNet (ELN) ⁴¹	12
Tab. 2.1.: Verwendete Geräte	26
Tab. 2.2.: Verwendete Verbrauchsgüter und Equipment.....	26
Tab. 2.3.: Verwendete Reagenzien und Chemikalien.....	27
Tab. 2.4.: Puffer und Lösungen mit Anleitung zur Herstellung.....	28
Tab. 2.5.: Medienzusätze.....	28
Tab. 2.6.: Zusätze für molekularbiologische Arbeiten.....	29
Tab. 2.7.: Kommerziell erwerbbare Medien.....	29
Tab. 2.8.: Spezielle Medien und deren Zusammensetzung.....	29
Tab. 2.9.: Medien für die Bakterienkultur	29
Tab. 2.10.: Zytokine	30
Tab. 2.11.: Enzyme	30
Tab. 2.12.: Antikörper für die Durchflusszytometrie	30
Tab. 2.13.: Isotypkontrollen	31
Tab. 2.14.: Sekundär Antikörper	31
Tab. 2.15.: ELISpot Antikörper.....	31
Tab. 2.16.: Blockierende Antikörper.....	32
Tab. 2.17.: Verwendete Kits.....	32
Tab. 2.18.: Oligonukleotide.....	32
Tab. 2.19.: Vektoren.....	35
Tab. 2.20.: HLA-DP Allele der AML Patienten.....	36
Tab. 2.21.: HLA-DP Allele der EBV-LCLs	36
Tab. 2.22.: HLA-DP Allele der Fibroblastenspender.....	36
Tab. 2.23.: HLA-DP Allele der PBMZ Spender.....	36
Tab. 2.24.: Bakterienstämme.....	37
Tab. 2.25.: Programme	37
Tab. 3.1.: Ursprung der T-Zell-Klone aus den allogenen gemischten Lymphozyten-Leukämie-Kulturen.....	61
Tab. 3.2.: Übersicht der TZR charakterisierenden Elemente der isolierten TZR _{DPB1} -Ketten der T-Zell-Klone 2C4, 1F3 und 11C12	62
Tab. 3.3.: Nomenklatur der verwendeten EBV-LCLs	66
Tab. 3.4.: Spezifische Lyse der TZR _{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen gegenüber AML Blasten verschiedener Spender.....	79
Tab. 3.5.: Spezifische Lyse der TZR _{DPB1*04:01} transfizierten T-Zellen gegenüber Gewebezellen	81
Tab. 3.6.: Überblick der CD4 ⁺ T-Zell-Populationen	94

6.4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	For	<i>forwards</i>
4-1BB	Ligand des Tumornekrosefaktor-Rezeptors	FSC	Vorwärtsstreulicht
⁵¹ Cr	radioaktives Chrom-Isotop	G	Guanin
A	Adenin	g	Gramm
Abb	Abbildung	G-CSF	Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol	GI	gastrointestinaler Trakt
Ak	Antikörper	GM-CSF	Granulozyten-Monozyten koloniestimulierender Faktor
allo	allogen	GO	Gemtuzumab Ozogamicin
AML	akute myeloische Leukämie	GvHD	Spender-gegen-Empfänger Erkrankung, <i>Graft-versus-Host-Disease</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>	GvL	Spender-gegen-Leukämie, <i>Graft-versus-Leukemia</i>
APC	Allophycocyanin	Gy	Gray
APZ	Antigen-präsentierende Zelle	h	human
ARCA	Anti-Reverse Cap Analogon	H ₂ O	Wasser
ATG	<i>anti-thymocyte globulin</i>	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
BSA	Bovines Serumalbumin	HaCaT	<i>human adult low calcium high temperature</i>
BTLA	<i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>	HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperizan-N'-ethansulfonsäure
C	Cytosin	HLA	Haupthistokompatibilitätskomplex
CCR	Chemokin-Rezeptor	HRP	Meerrettichperoxidase
CD	Differenzierungscluster	HS	Humanserum
cDNA	komplementäre DNA	HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
CDR	komplementaritätsbestimmende Region	i.v.	intravenös
CEBPA	<i>CCAAT enhancer binding protein</i>	ICOS	<i>inducible T-cell costimulator</i>
chim	chimär	IFN-γ	Interferon-γ
Ci	Curie	Ig	Immunglobulin
CIP	<i>calf-intestinal-phosphatase</i>	IL	Interleukin
cm ²	Quadratzentimeter	IMGT	ImMunoGeneTics
CMV	Cytomegalie Virus	IP ₃	Inositoltriphosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
CR	komplette Remission	IS	immunologische Synapse
cSMAC	<i>central SMAC</i>	ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
CTL	zytotoxische T-Zelle	ITD	interne Tandemduplikation
CTLA-4	zytotoxische T-Lymphozyten assoziiertes Protein 4	Itk	<i>interleukin-2- inducible T-cell kinase</i>
D	Diversitäts-Gensegment	IU	<i>International Unit</i>
DAG	Diacylglycerol	IVT	<i>in vitro</i> transkribiert
dd	doppelt destilliert	J	verbindendes Gensegment
Del	Deletion	K	konstantes Gensegment
DLI	Donorlymphozyteninfusion	KIR	<i>killer cell immunoglobulin like receptor</i>
DMF	N,N-Dimethylformamide	KM	Knochenmark
DMSO	Dimethylsulfoxid	koop	kodonoptimiert
DNA	Desoxyribonukleinsäure	KR	komplette Remission
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate	Kα	konstante TZRα-Domäne
Don	Donor	Kβ	konstante TZRβ-Domäne
ds	doppelsträngig	l	Liter
dSMAC	distal SMAC	LAA	Leukämie-assoziierte Antigene
DTT	Dithiothreitol	LAT	<i>linker for activation of T cells</i>
DZ	dendritische Zelle	LB	Luria Bertani
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>	Lck	Lymphozyten-spezifische Protein Tyrosin Kinase
E:T	Effektor- zu Zielzell-Verhältnis	LD	Kopplungsungleichgewicht
EBV	Epstein-Barr Virus	LDH	Laktatdehydrogenase
EBV-LCL	Epstein-Barr-Virus transformierte lymphoblastoide Zelllinie	LP	Leukapherese Produkt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	LPS	Lipopolysaccharid
ELISpot	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Spot</i>	LTR	lange endständige Sequenzwiederholung, <i>long terminal repeats</i>
ELN	<i>EuropeanLeukemiaNet</i>	m	milli
ER	endoplasmatisches Retikulum	M	Molarität
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>	m	murin
EtOH	Ethanol	m.	männlich
F2A	Furin-2A	MACS	magnetische Zellseparation
FAB	<i>French-American-British</i>	mAk	monoklonaler Antikörper
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellanalyse	MDS	myelodysplastische Syndrom
Fb	Fibroblast		
FcR	Fc-Rezeptor		
FCS	Fetales Kälberserum		
FITC	Fluoresceinisothiocyanat		
FLT3	Fms-ähnliche Tyrosinkinase 3		

mDZ	gereifte dendritische Zelle	T _{reg}	regulatorische T-Zellen
MFI	mediane Fluoreszenzintensität	TZE	T-Zell-Epitop
mHAg	Minor-Histokompatibilitätsantigene	TZR	T-Zell-Rezeptor
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	TZR _{DPB1}	allo-HLA-DPB1 spezifischer TZR
min	Minute	U	Einheiten
ml	Milliliter	Upm	Umdrehungen pro Minute
MLR	gemischte Lymphozyten Reaktion	UTR	untranslatierter Bereich
MMLV	murines Moloney Leukämievirus	UV	Ultraviolette
mM	milli Molar	V α	variable TZR α -Domäne
MRD	minimale Resterkrankung	V β	variable TZR β -Domäne
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure	w.	weiblich
n	nano	w/o	ohne
n.e.	nicht eindeutig ermittelbar	WHO	Weltgesundheitsorganisation
n.t.	nicht getestet	WT	Wildtyp
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>	WT1	Wilms' Tumor 1
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren	ZAP70	<i>zeta-chain-associated protein kinase of 70kDa</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>	ZTL	zytotoxische T-Zelllinie
NF κ B	<i>nuclear factor κ of activated B-cells</i>	μ	mikro
NK	natürliche Killerzelle		
NLV	NLVMVATY-Peptid		
NPM1	<i>Nucleophosmin 1</i>		
NSG	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Wjl} /SzJ		
p	piko		
p-Arm	kurzer Chromosomarm		
PBMZ	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes		
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung		
PCR	Polymerase Ketten Reaktion		
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>		
PD-1L	<i>Programmed Cell Death Protein 1 Ligand</i>		
PE	Phytoerythrin		
PE-Cy7	Phycoerythrin-cyanine7		
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin		
PGE ₂	Prostaglandin E ₂		
pHLA	peptidbeladenes HLA		
PI-3K	Phosphoinositid-3-Kinase		
PIP ₂	Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat		
PLC- γ	Phospholipase C- γ		
pp65	Phosphoprotein 65		
PR-1	<i>pathogenesis-related protein 1</i>		
PR3	Proteinase 3		
pSMAC	<i>peripheral SMAC</i>		
RasGRP	<i>Ras guanyl-releasing protein</i>		
Rev	<i>reverse</i>		
rh	rekombinant human		
rMFI	relativer Median der Fluoreszenzintensität		
RNA	Ribonukleinsäure		
RT	Raumtemperatur		
SCF	Stammzellfaktor		
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt		
SD	Standardabweichung		
SDS	Sodium-Dodecylsulfat		
sec	Sekunde		
SEM	Standardfehler des Mittelwerts		
SLAM	<i>signaling lymphocytic activation molecule</i>		
SLP-76	<i>SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa</i>		
SMAC	supramolekulare Aktivierungscluster		
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus		
SSC	Seitwärtsstreulicht		
sscDNA	<i>single stranded cDNA</i>		
Std	Stunde		
T	Thymin		
t	Translokation		
Tab.	Tabelle		
TAP	Transporter der Antigenpräsentation		
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor β		
T _H 1/T _H 2	T Helfer Zelle 1/2		
TLR	Toll ähnlicher Rezeptor		
TNF- α	Tumornekrosefaktor α		

7 Appendix

7.1 Selbstständigkeitserklärung

“Ich, Vatter, Sarah geboren am 15.02.1988 in Ludwigshafen am Rhein, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.“

Regensburg, den 27.11.2017:

7.2 Danksagung

Die letzten Zeilen und Sätze dieser Arbeit möchte ich all denjenigen Personen widmen, die mir in den letzten vier Jahren mit Rat und Tat beiseite standen und ohne deren Zutun diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre!

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Simone Thomas für das spannende und interessante Thema, welches Du mir anvertraut hast. Für Deine Unterstützung und Förderung, Deine Betreuung, die anregenden Diskussionen und die frühzeitige Möglichkeit an Kongressen teilzunehmen.

Danke!

Einen herzlichen Dank möchte ich auch an meine drei Mentoren Herr Prof. Dr. Wolfgang Herr, Herr Prof. Dr. Udo Hartwig und Herr Prof. Dr. Andreas Teufel richten. Sie haben mich durch Ihre interessanten Vorschläge, Gespräche sowie konstruktive Kritiken innerhalb der Kolloquien stets gefördert und vorangetrieben. Dabei möchte ich insbesondere Herrn Prof. Dr. Wolfgang Herr danken, an den ich mich immer wenden konnte und der mich stets mit seinen positiven Worten aufbauen konnte, auch wenn es mal nicht so gut lief!

Danke!

Danke auch an alle die mich neben Herr Prof. Dr. Wolfgang Herr und Herr PD Dr. Udo Hartwig am Tag meiner Promotionsprüfung begleiten werden. So gilt mein Dank Prof. Dr. Ralf Wagner, Frau Prof. Dr. Marina Kreutz und Prof. Dr. Dr. Andre Gessner.

Danke!

Danken möchte ich auch der ganzen Arbeitsgruppe um Frau PD Dr. Thomas für den immer wieder fröhlichen Arbeitsalltag und das gegenseitige wiederaufbauen! Hierbei gilt mein besonderer Dank Dr. Sebastian Klobuch, der mich nicht nur neben seines Klinikumsalltags emsig eingearbeitet hat, sondern auch, dass er immer und in jeder Situation ein offenes Ohr für mich, meine Sorgen und Probleme hatte! Ein Dank an Dr. Maximilian Schmid für die Korrektur dieser Arbeit und all der Hilfe in Sachen FACS! Aber der größte Dank innerhalb der AG gilt Carina Mirbeth für Deine Menschlichkeit, Herzlichkeit, Loyalität und nur so selten getrübt Fröhlichkeit. Aber auch für Deine praktische Hilfe gerade im letzten Abschnitt dieser Arbeit!

Danke!

Aber auch der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Michael Rehli, um Frau Prof. Dr. Marina Kreutz sowie der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Petra Hoffmann will ich hiermit danken. Anfangs wusste ich nicht, wo sich im H1 was befindet und was ich von wem nutzen darf. Ihr wart meine Rettung! Insbesondere möchte ich jedoch Christin maßlos Danken, erst Arbeitskollegin aber mittlerweile Freundin, die ich nie mehr missen möchte. Danke für Deine unzählbare Unterstützung!

Danke!

Aber was wäre so eine Arbeit ohne die Unterstützung von Freunde und Familie? Ohne meine Familie wäre ich nie so weit gekommen. Danke für Euer grenzenloses Vertrauen und Eure unglaubliche Unterstützung. Ihr seid der Grundstein, der das hier erst möglich gemacht hat!

Danke!

Meine letzten Zeilen gehen an Dich Lukas! Danke, dass Du mich in die letzten vier Jahre so geduldig ertragen, mich unermüdlich wiederaufgerichtet und mich immer verstanden hast, auch wenn es bestimmt nicht immer (besonders im letzten Jahr) leicht war. Danke, dass Du immer an mich geglaubt hast und mir gezeigt hast, dass ich selbst an mich glauben kann!

Danke!

7.3 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Sarah Vatter
Fischmarkt 1
93047 Regensburg
15.02.1988 in Ludwigshafen am Rhein
Tel.: 0176/80496432
E-Mail: Sarah.Vatter@web.de

AUSBILDUNG

seit 2013:
Promotion am Universitätsklinikum Regensburg
Ausstehender Abschluss: Doktor der Humanbiologie und Biomedizin
Titel der Arbeit: „HLA-DP-spezifische T-Zell-Rezeptoren als
Immuntherapeutika zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie“

2010 – 2013:
Studium der Biologie an der Universität Regensburg
Abschluss: Master of Science
Gesamtabschlussnote: 1,3
Titel der Abschlussarbeit: „Die Rolle des transkriptionellen Regulators NF1
im malignen Melanom“

2007 – 2010:
Studium der Biowissenschaften an der TU Kaiserslautern
Abschluss: Bachelor of Science
Gesamtabschlussnote: 2,4
Titel der Abschlussarbeit: „Die regulatorische Rolle der csRNA5 in
Streptococcus pneumoniae“

1998 – 2007:
Carl-Bosch-Gymnasium
Abschluss: Abitur
Gesamtabschlussnote: 2,3
Thema der Facharbeit am DKfZ Heidelberg: „Bedeutung der humanen 15-
Lipoxygenase und 5-Lipoxygenase bei der Tumorgenese des Pankreas“

BEITRAG ZU KONGRESSSEN

- Abstract als Erstautor und Vortrag bei der Jahrestagung der "Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie" 2014 in Hamburg
- Abstract als Co-Autor zum GvH/GvL Symposium 2016 in Regensburg
- Abstract als Erstautor bei der Jahrestagung der "Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie" 2016 in Leipzig

PUBLI-
KATIONEN

- HLA-DPB1 mismatch alleles represent powerful leukemia rejection antigens in CD4 T-cell immunotherapy after allogeneic stem-cell transplantation (Herr W, Eichinger Y, Beshay J, Bloetz A, Vatter S, Mirbeth C, Distler E, Hartwig UF, Thomas S. Leukemia, Februar 2017).
- In Vorbereitung:
In-vitro blockade of the CD4 receptor co-signal in antigen-specific T-cell stimulation cultures induces the outgrowth of potent CD4 independent T-cell effectors (Vatter S., Schmid M., Gebhard C., Mirbeth C., Klobuch S., Rehli M., Herr W., Thomas S.)

FORT-
BILDUNGEN/
WORKSHOPS

- Versuchstierkunde & Tierschutz (FELASA B) (Seminar mit Abschlussprüfung)
- Durchflusszytometrie (Workshop)
- ELISPOT (Workshop)